



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

DETECCIÓN DE *Mycobacterium*
tuberculosis EN ESTADO DE LATENCIA
EN MUESTRAS CLÍNICAS

Tesis Doctoral
Noelia Cubero de Frutos

2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

DETECCIÓN DE *Mycobacterium*
tuberculosis EN ESTADO DE LATENCIA
EN MUESTRAS CLÍNICAS.

Memoria presentada por Noelia Cubero de Frutos para aspirar al Grado de Doctor en Medicina. Ha sido realizada en el Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología de la Universidad Autónoma de Madrid y dirigida por la Dra. M^a Jesús García García.

Madrid, Septiembre de 2009



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA, SALUD PÚBLICA y MICROBIOLOGÍA
c/Arzobispo Morcillo s/n. 28029 Madrid

Dra. MARÍA JESÚS GARCÍA GARCÍA, Profesora Titular de Microbiología de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICA:

Que la Licenciada NOELIA CUBERO DE FRUTOS, ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título "Detección de *Mycobacterium tuberculosis* en estado de latencia en muestras clínicas".

Considero que dicho trabajo recoge una investigación original realizada por la interesada, quien ha demostrado notable capacidad de trabajo y mucho interés durante su elaboración. El trabajo representa una aportación novedosa en la comprensión del proceso patológico de la Tuberculosis y reúne todos los requisitos necesarios para su presentación como memoria de Doctorado, al objeto de optar al Grado de Doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Madrid, 2 de Septiembre de 2009.

Fdo: Dra MARÍA JESÚS GARCÍA GARCÍA



*A mis padres,
lo más valioso que poseo,
por haberme acompañado.*



Esta tesis doctoral, representa el final de una de las etapas más importantes en mi vida y el inicio de otra que espero, será aun más enriquecedora.

Ha requerido esfuerzo y mucha dedicación por mi parte y no hubiese sido posible, sin la cooperación de numerosas personas.

Agradezco a la Dra. María Jesús García García, Directora de esta tesis doctoral, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad. Con ella he compartido el duro trabajo y espero compartir la grata recompensa del éxito.

Mi eterna gratitud al Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología por haberme acogido y abierto sus puertas.

A las Dras. Carmen Menéndez Gómez y Carmen Núñez Serrano, siempre dispuestas a resolver dudas, apoyándome en lo que fuera necesario. Sus aportaciones han sido esenciales para el desarrollo metodológico del presente trabajo.

Quiero agradecer a la Doctora Elia Palenque, del Departamento de Microbiología del Hospital Doce de Octubre y al Doctor Jaime Esteban Moreno del Departamento de Microbiología de la Fundación Jiménez Díaz, por su colaboración desinteresada aportando datos esenciales en este estudio y por el material suministrado, indispensable para la elaboración de esta Tesis.

A todos los compañeros que desde que inicié mi formación, me han transmitido la dedicación a la profesión.

A mis padres, que son y serán siempre el pilar de mis inquietudes y esfuerzos. Mis logros son fruto de su labor y de su cariño.

Por último quiero dar las gracias a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, a todos aquellos que me ofrecieron una sonrisa en tiempos difíciles, a quienes consiguieron hacer de una conversación un proyecto de amistad, a todos aquellos que han puesto de su parte para que el trajín diario sea más llevadero y muy en especial a la vida que, como dijera Violeta Parra, me ha dado tanto.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	PÁG 1
1.- HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS	6
1.1.- CIVILIZACIONES ANTIGÜAS	7
1.2.- EDAD MEDIA Y RENACIMIENTO	8
1.3.- SIGLOS XVII Y XVIII	9
1.4.- SIGLO XIX: LA ENFERMEDAD ROMÁNTICA	10
1.5.- ROBERT KOCH	11
1.6.- SIGLO XX	12
1.7.- SIGLO XXI	13
2.- TUBERCULOSIS Y CULTURA	14
2.1.- LITERATURA	14
2.2.- PINTURA	16
3.- CARACTERÍSTICAS Y TAXONOMÍA DE LAS MICOBACTERIAS	17
3.1.- EL GÉNERO <i>MYCOBACTERIUM</i>	17
3.2.- CARACTERÍSTICAS GENERALES	18
3.2.1 Estructura general	18
3.2.1.1 Cápsula	18
3.2.1.2 Pared Celular	19
3.2.1.3 Membrana Citoplasmática	19
3.2.2 Metabolismo	19
3.2.3 Genoma	20
3.3.- TAXONOMÍA	21
4.- CLÍNICA DE LA TUBERCULOSIS	23
4.1.- TRANSMISIÓN Y PATOGENIA	23
4.2.- DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA TUBERCULOSIS	25
4.2.1 Prueba de la tuberculina	25
4.2.2 Técnicas <i>in vitro</i> de interferón -gamma (IFN-©)	27
4.2.2.1 Determinación de Interferón -gamma	28
4.2.3 Valoración Clínica	29
4.2.3.1 Tuberculosis pulmonar	29
4.2.3.2 Tuberculosis extrapulmonar	30
4.2.3.3 Análisis de líquidos corporales	31
4.2.4 Técnicas de Imagen	32
5.- DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS	34
5.1.- TOMA DE MUESTRAS	34
5.2.- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CLÁSICOS	36
5.2.1 Tinción y examen microscópico	36
5.2.2 Cultivo de las micobacterias	37

5.2.2.1 Métodos de cultivo rápido	39
5.2.3 Técnicas bioquímicas para la identificación de las micobacterias	41
5.2.4 Diagnóstico serológico	42
5.2.5 Análisis de los ácidos micólicos de la pared	43
5.3.- TÉCNICAS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO	44
5.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa	44
5.3.1.1 Fundamentos	45
5.3.1.2 Aspectos técnicos	46
5.3.1.3 Optimización de la PCR	48
5.3.1.4 Tipos de PCR	50
5.3.1.5 PCR en tiempo real (PCRtr)	51
5.3.2 Otros métodos moleculares	53
5.3.2.1 Sondas genéticas	53
5.3.2.2 PCR-RFLP	54
6.- TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS	55
6.1.- FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS	55
6.1.1 Esquemas terapéuticos recomendados	55
6.1.1.1 Tuberculosis extrapulmonar	56
6.1.1.2 Tuberculosis infantil	56
6.1.1.3 Otros tratamientos coadyuvantes	56
6.1.1.4 Situaciones especiales	57
6.1.2 Tratamiento de la infección latente	57
6.2.- RESISTENCIAS	57
6.2.1 Tuberculosis Multirresistente y Extremadamente resistente	58
6.3.- NUEVOS TRATAMIENTOS ANTITUBERCULOSOS	59
6.4.- PROFILAXIS	60
6.4.1 Vacunación	60
7.- LATENCIA DE LA TUBERCULOSIS	63
7.1.- CONCEPTO DE LATENCIA	63
7.2.- LA LATENCIA EN <i>M. tuberculosis</i>	64
7.3.- MODELOS DE LATENCIA	66
7.4.- ESTABLECIMIENTO DE LATENCIA BACTERIANA	67
7.5.- MECANISMOS DE SALIDA DE LATENCIA BACTERIANA	69
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
1.- HIPÓTESIS	71
2.- OBJETIVOS	72

III. MATERIALES Y MÉTODOS	73
1.- MATERIALES	73
1.1.- MUESTRAS	73
1.2.- REACTIVOS UTILIZADOS	74
2.- MÉTODOS	75
2.1.- AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS	75
2.2.- RETROTRANSCRIPCIÓN	77
2.3.- AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL	77
2.3.1 Características de las dianas que se han amplificado	79
2.3.2 Cuantificación de los productos de PCR	80
2.3.3 Confirmación de la amplificación	81
3.- ANÁLISIS DE LAS HISTORIAS CLÍNICAS	83
IV. RESULTADOS	85
1.- MUESTRAS CLÍNICAS	85
1.1.- TIPOS DE MUESTRAS	85
1.1.1 Pulmonares	85
1.1.2 Extrapulmonares	85
1.2.- RESULTADOS DE LOS LABORATORIOS CLÍNICOS	86
1.3.- DETECCIÓN DE DNA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL	87
1.4.- DETECCIÓN DE cDNA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL	92
1.5.- RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE PCR EN TIEMPO REAL	97
2.- HISTORIAS CLÍNICAS	100
2.1.- HISTORIAS CLÍNICAS SEGÚN EL SEXO Y LA EDAD DE LOS PACIENTES	100
2.1.1 Resultados según el sexo	100
2.1.1.1 Mujeres	100
2.1.1.2 Varones	101
2.1.2 Resultados según la edad	102
2.2.- HISTORIAS CLÍNICAS EN RELACIÓN CON EL RESULTADO DE PCR PARA <i>M. tuberculosis</i>	104
2.2.1 Pacientes de muestras con resultado negativo	104
2.2.2 Pacientes de muestras con resultado positivo	106
2.2.2.1 Pacientes con muestras positivas únicamente para DNA de <i>M. tuberculosis</i> (IS6110).	106
2.2.2.1.1 Muestras pulmonares positivas	106
2.2.2.1.2 Muestras extrapulmonares positivas	107
2.2.2.2 Pacientes con muestras positivas para cDNA de <i>M. tuberculosis</i>	108

2.2.2.2.1 Muestras pulmonares cultivo positivo	108
2.2.2.2.2 Muestras extrapulmonares cultivo positivo	109
2.2.2.2.3 Muestras pulmonares cultivo negativo	110
2.2.2.2.4 Muestras extrapulmonares cultivo negativo	112
V. DISCUSIÓN	115
1.- AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE MUESTRAS CLÍNICAS	117
2.- DETECCIÓN DE DNA EUCARIOTA	119
3.- DETECCIÓN DE DNA DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	120
4.- DETECCIÓN DE cDNA DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	122
4.1.- Detección únicamente de cDNA de <i>M. tuberculosis</i>	123
4.2.- Detección de DNA y cDNA de <i>M. tuberculosis</i>	125
5.- DETECCIÓN DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> VIABLES NO CULTIVABLES	127
VI. CONCLUSIONES	131
ANEXO A LOS RESULTADOS	135
1.-RESULTADOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS REALIZADOS EN LOS HOSPITALES PARTICIPANTES	135
2.- RESÚMENES DE LAS HISTORIAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES	141
ABREVIATURAS	153
ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS Y TABLAS	157
BIBLIOGRAFÍA CITADA	161
BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA NO CITADA	175

I- INTRODUCCIÓN

El 24 de marzo ha sido instaurado como día mundial contra la tuberculosis: "la enfermedad de la injusticia". La Tuberculosis (TB) es una de las enfermedades más antiguas, pudiendo considerarse la que más muertes ha causado a la humanidad.

El Dr. José Caminero, miembro del comité *Luz Verde*, de la OMS y coordinador de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) del Año 2008 para la Tuberculosis y la Solidaridad, define la tuberculosis como *una enfermedad social*. Según este especialista "únicamente con un adecuado reparto de la riqueza en el mundo y sin ninguna otra intervención, la tuberculosis acabaría erradicándose sola". (http://www.separ.es/noticias/incidencia_tuberculosis_reparto_riqueza.html)

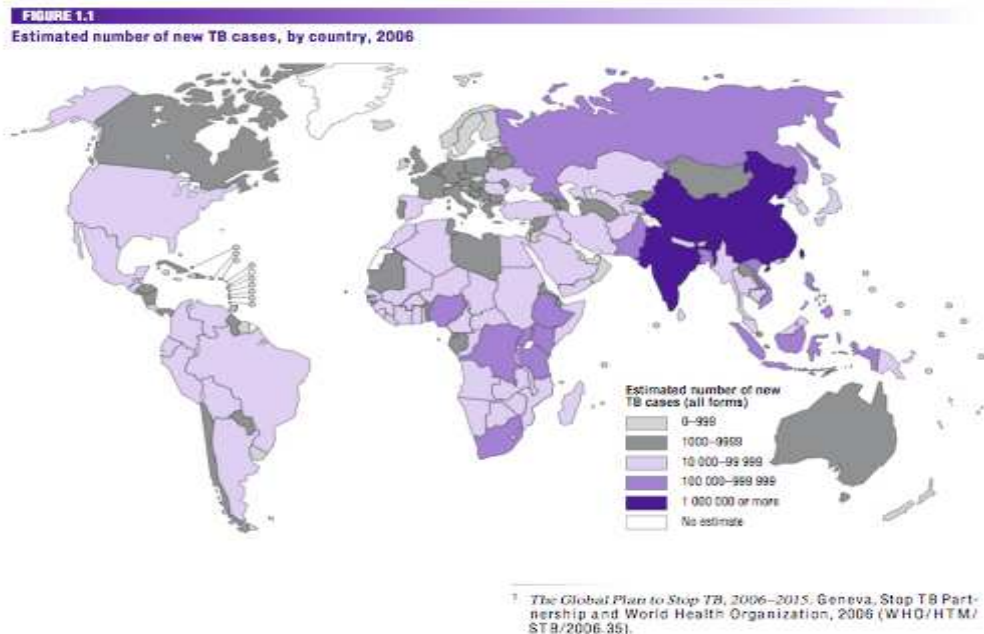


Figura 1: Incidencia de la TB en el mundo según la OMS 2008

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se calcula que en el mundo están infectados por *Mycobacterium tuberculosis* unos 1.700 millones de habitantes, lo que representa la tercera parte de la población mundial. Este reservorio condiciona que se produzcan anualmente entre 8 y 10 millones de casos nuevos de enfermedad, con una prevalencia aproximada de 14-18 millones de enfermos (report WHO). Además, debido a que la tasa de disminución de los casos nuevos de TB es más baja que la tasa de aumento de la población, es probable que, actualmente, existan más tuberculosos que en 1882, año en el que Robert Koch descubrió el bacilo. Estos datos son aún más alarmantes si se tiene en cuenta que cada año mueren en el mundo de TB más de 1,5 millones de personas.

Uno de los principales factores que favorecen la alta tasa de incidencia de la TB en el mundo es la pobreza y las desigualdades económicas. Los países con una menor renta per cápita coinciden con aquellos países donde el número de enfermos de tuberculosis es más elevado. En el mundo, 22 países capitalizan el 80% de los enfermos de tuberculosis, entre ellos India, China, Sudáfrica, Rusia y Brasil.

Pero son Swazilandia, Djibouti, Namibia, Lesotho y Zimbabue los cinco países que encabezan la trágica lista de los quince con mayor incidencia de tuberculosis. En estos países, además, la alta tasa de la patología pulmonar está acompañada por la alta prevalencia de la infección por VIH. Swazilandia es el país que tiene la esperanza de vida más baja del mundo, 32 años. Mientras se observa que en África aumenta el número de enfermos de tuberculosis, el número de afectados por esta enfermedad y su mortalidad desciende en los países ricos. Y al observar la incidencia de la tuberculosis en los países ricos coincide en que esta enfermedad está ligada a las personas con rentas más bajas. A la pobreza y las desigualdades económicas se suman, como factores asociados a la tuberculosis, la infección por VIH, la inmigración de afectados de países con alta endemia, el impacto de la tuberculosis multirresistente (MDR) (cifra estimada de casos en 2006 0,5 millones) y el no aplicar buenos programas de control.

El Dr. Julio Ancochea, presidente de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía torácica (SEPAR), define la tuberculosis como "la enfermedad de la injusticia" y asegura que "luchar por la mejora de las condiciones socio-económicas de la población inmigrante es un factor esencial en la batalla contra la tuberculosis". (<http://www.elmundo.es/elmundosalud/2007/03/23/biociencia/1174651187.html>)

Según un informe emitido en 2005 por el *European Centre for Disease Prevention and Control*, España registra 18,3 casos de tuberculosis cada 100.000 habitantes. Con esta tasa, España se sitúa en noveno lugar en Europa, tras Rumania (126,9), Lituania (75,1), Letonia (58), Bulgaria (42), Estonia (34), Portugal (32,4), Polonia (22,5) y Hungría (18,8). (http://ecdc.europa.eu/en/Health_Topics/tuberculosis/aer_07.aspx)

En España, la tuberculosis se sitúa como la cuarta enfermedad de declaración obligatoria (EDO) en incidencia, según los últimos datos correspondientes a 2007 del *Centro Nacional de Epidemiología*, sólo superada por la gripe, la varicela y las paperas.

SEPAR maneja unas cifras que reflejan las altas tasas de la tuberculosis en España - entre 10.000 y 12.000 casos nuevos anuales. Según datos del Centro Nacional de Epidemiología, en 2007 se produjeron 5.795 casos de tuberculosis en España, sólo 56 casos menos que en 2006. Sin embargo, se estima que una tercera parte de los casos no se notifican a pesar de tratarse de una EDO nominal, por lo que estas cifras son necesariamente más elevadas.

Según estimaciones de la OMS pertenecientes a ese mismo año, la TB en España afecta a 25 de cada 100.000 habitantes.

En datos absolutos para 2007, por Comunidades Autónomas y según los datos provisionales del Centro Nacional de Epidemiología, Cataluña encabeza la lista de casos detectados de tuberculosis (1.343), seguida de cerca por Andalucía (916), Madrid (783) y Valencia (580). En cambio, en proporción al número de habitantes, Ceuta (55,90 casos por 100.000 habitantes) y Melilla (20,78) se sitúan en primer lugar, y Aragón (20,15) y Cataluña (19,09) en tercer y cuarto, respectivamente.

En el año 2006, Cataluña encabezó la lista de casos detectados de tuberculosis (1.118), seguida igualmente por Andalucía (944): ambas Comunidades Autónomas siguen registrando el número más elevado de casos detectados. Madrid, que registró en 2006 870 casos, se mantiene en tercer puesto al igual que la Comunidad Valenciana que ya se situaba en el cuarto lugar con 665 casos. En relación al número de habitantes, en 2006, Ceuta asumió el 31,54 por 100.000 habitantes y Melilla el 21,52 al igual que en 2007 ambos, se situaban en primer lugar. A la zaga de Melilla se situaba Cataluña con 18,54 casos seguida de País Vasco con 18,12 casos por 100.000 habitantes y por Madrid con 17,19.

España está experimentando un gran cambio demográfico debido a la llegada masiva de personas procedentes de países en vías de desarrollo. En pocos años se han establecido en el país más de cuatro millones de personas originarias de zonas con elevada prevalencia de tuberculosis.

El hecho inmigratorio ha propiciado un patrón epidemiológico ya conocido desde hace años en la Europa Occidental, con porcentajes muy elevados de casos que corresponden a pacientes nacidos en otros países. El Dr. José Gallardo, neumólogo especialista en tuberculosis y miembro de SEPAR, afirma que "en zonas españolas con elevada inmigración se aprecian porcentajes comprendidos entre el 30 y el 50% de enfermos inmigrantes, similares a los constatados en EEUU y en diversos países de la Europa Occidental". (http://www.separ.es/noticias/tuberculosis_Espana_noveno.html)

Las asignaturas pendientes en el tratamiento de la tuberculosis en nuestro país, pasan por que cada Comunidad Autónoma disponga de un buen programa de control en el que se coordinen clínicos de diversas especialidades: neumólogos, microbiólogos, epidemiólogos, médicos de atención primaria, etc. Además, sería conveniente que cada centro sanitario con más de 20 casos anuales dispusiera de unidades específicas para TB donde también se estudiaran los contactos. La TB se transmite por vía respiratoria: cuando el paciente tose, habla, canta... expulsa bacilos que pueden transmitir la infección si son inhalados por otra persona, aunque, en general, para contagiar la TB se requiere un contacto íntimo y continuado. Muchos casos de TB serían evitables si en su momento, cuando se diagnosticó a su caso índice, se hubiera procedido a un buen estudio de contactos.

Por otra parte, en cuanto a microbiología, se deberían practicar antibiogramas sistemáticos y realizar estudios de epidemiología molecular en aquellos lugares donde hubiere buenos estudios de contactos. Finalmente, en cuanto a salud pública, los programas de control deberían disponer de enfermeras de salud pública y agentes comunitarios de salud que actuaran como mediadores culturales y como traductores.

El 24 de marzo de 2008, en su mensaje por el Día Mundial de la Tuberculosis, el Secretario General de la ONU, Ban Ki-moon, instó a tomar las medidas necesarias para detener esta enfermedad, que se cobra diariamente 4.000 vidas.

Nunca venceremos la TB sin nuevos y más efectivos métodos de diagnóstico, tratamiento y vacunación. El método de diagnóstico de TB más usado hoy en día, la baciloscopia de esputo, tiene más de 100 años de antigüedad y una sensibilidad limitada, la concentración más baja de microorganismos que se puede detectar mediante examen microscópico es de 10^4 bacilos/mL de muestra. Hace algo más de 10 años se han desarrollado métodos de amplificación genética. Las pruebas de biología molecular, actualmente en uso en el laboratorio para el diagnóstico de tuberculosis, son aceptables en la tuberculosis pulmonar, pero insuficientes en las formas paubacilares de la enfermedad, como ocurre en la meningitis tuberculosa y, en general, en la de tuberculosis extrapulmonar (American Thoracic Society, 2000).

Los medicamentos contra la TB usados actualmente tienen más de 40 años y deben ser tomados entre 6 y 9 meses. Desde los grandes avances en el tratamiento de esta enfermedad a mediados del siglo XX, no se han producido otros nuevos hasta los últimos cinco años en que ha habido un resurgimiento del desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos, de los cuales seis ya están en las primeras fases clínicas. De todos ellos los que más protagonismo alcanzan son las quinolonas de 4ª generación, en especial el gatifloxacino, y sobretodo el moxifloxacino. Mientras que el moxifloxacino es probable que se introduzca a partir del 2010 y permita acortar el tratamiento y dejarlo en solo 3-4 meses; el resto no se espera que puedan introducirse en la clínica antes del 2015 (Blumberg *et al*, 2005).

De manera similar, la vacuna antituberculosa vigente tiene más de 85 años de antigüedad y provee alguna protección contra formas graves de TB en niños, pero no protege contra la TB pulmonar. Necesitamos urgentemente vacunas que sean efectivas y prevengan la TB en personas de todas las edades, métodos de diagnóstico más precisos y rápidos y regímenes de tratamiento más simples y cortos para tratar todas las formas de tuberculosis.

En rueda de prensa en Ginebra, el doctor Giorgio Roscigno, director ejecutivo de la Fundación para Nuevos Diagnósticos Innovadores, señaló que hoy en día en los países en desarrollo seguimos utilizando instrumentos para el diagnóstico, que no son muy precisos. Por su parte, el doctor Robert Ridley, director del Programa Especial de la OMS para la Investigación y Capacitación

de Enfermedades Tropicales, sostuvo que también se necesita encontrar métodos que indiquen cómo están respondiendo los pacientes al tratamiento, identificar la resistencia a los antituberculosos y detectar infecciones latentes, particularmente en quienes corren mayor riesgo de padecer tuberculosis activa. (<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr42/es/index.html>)

Los avances terapéuticos y sanitarios de mediados del siglo XX parecían dar la razón a quienes, como la Organización Mundial de la Salud, hablaban de un siglo XXI en el que la tuberculosis sería un recuerdo del pasado. Se desactivaron servicios especializados, los antiguos sanatorios fueron cerrados o transformados en hospitales generales, y la Tisiología pasó a llamarse Neumología.

Sin embargo, el *Mycobacterium tuberculosis* no estaba definitivamente derrotado. La tuberculosis sigue planteando en la actualidad importantes problemas epidemiológicos, de diagnóstico clínico, microbiológicos y terapéuticos. La OMS sostiene que encontrar cómo detectar infecciones latentes podría revolucionar el control de la tuberculosis. (http://www.who.int/tb/challenges/hiv/tbhiv_collaborative_activities_es.pdf)



Figura 2: *La Miseria*, de Cristóbal Rojas

1.- HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS

Consunción, tisis, escrófula, mal de Pott, tabes mesentérica, mal del rey o plaga blanca: de todos estos modos se ha conocido a la tuberculosis a través de la historia. Las denominaciones que recibe en las diferentes culturas: *sosha* (india), *phythisis* (griega), *consumptione* (latina) o *chaky oncay*, (inca) hacen en todos los casos referencia a "secar" o "consumir", debido al aspecto debilitado y caquéctico de los pacientes afectados. Su alta tasa de mortalidad entre adultos de mediana edad y el surgimiento del romanticismo, como movimiento filosófico y cultural que primaba el sentimiento sobre la razón, se aliaron para idealizar a esta enfermedad como "la enfermedad de los artistas".

Una de las hipótesis más extendidas sobre el surgimiento del género *Mycobacterium* es la ofrecida por Mirko Grmeck en 1983. Según su modelo, el antepasado común denominado *Mycobacterium archaicum*, habría dado origen a los modernos *Mycobacterium*. Durante el Neolítico, se cree que pasó a tener un reservorio en animales. Esto, dio lugar a un primer espécimen del *Mycobacterium bovis*, que era aceptada como la más antigua de las especies. En relación con la domesticación de bóvidos salvajes en África por parte del hombre, se habría producido la mutación a *M. tuberculosis*. Según esta teoría se trataría de una especie joven, aunque bastante anterior a la aparición de la otra gran patógena del grupo: *M. leprae*. Esta teoría se completa con la propuesta de que la epidemia de lepra en la Europa medieval iría decayendo espontáneamente por un mecanismo de competición inmunológica entre ambas especies (*M. tuberculosis* iría "ocupando" progresivamente el nicho inmunológico de *M. leprae*) (Rothschild *et al*, 2001)

Recientemente, el estudio comparativo de genomas completos de distintos miembros del complejo *M. tuberculosis*, junto a los datos de distribución de mutaciones en dichos genomas, ha aportado nueva luz a la hipótesis anterior. La genómica comparativa indica que existió una bacteria tuberculosa primitiva (denominada *M. prototuberculosis*) de la que existe un

representante actual (*M. cannettii* cepa que se aisló de pacientes africanos). Dicha bacteria primitiva, por adquisición de genes de adherencia celular, evolucionó de una vida preferentemente ambiental a ser un patógeno intracelular de éxito. Dicho patógeno, divergió en dos ramas al menos: como patógeno animal (*M. bovis*) y como patógeno humano (*M. tuberculosis*) (Gutiérrez *et al*, 2006).

Las primeras evidencias de la enfermedad en humanos se han encontrado en restos óseos del Neolítico, en un cementerio próximo a Heidelberg, supuestamente pertenecientes a un adulto joven, y datados en torno a 9000 años antes de nuestra era (HersHKovitz *et al*, 2008). Algún autor atribuye a la tuberculosis el título de ser la primera enfermedad conocida de la humanidad, sin embargo, ésta enfermedad no constituyó un problema importante hasta que las condiciones de hacinamiento de la vida urbana de las primeras épocas de la revolución industrial crearon las circunstancias epidemiológicas favorables para su diseminación. No es posible conocer con exactitud su magnitud (incidencia y prevalencia) con anterioridad al siglo XIX. Se considera, que el periodo de mayor extensión (por porcentaje de población afectada) transcurrió entre los siglos XVIII y XIX cuando se estima que constituyó la causa de la cuarta parte de las muertes en adultos de Europa.

1.1 CIVILIZACIONES ANTIGÜAS



Figura 3: Grabado Egipcio

Se han encontrado datos sugestivos sobre la tuberculosis en momias egipcias datadas entre los años 3000 y 2400 a.C. que presentan una destrucción característica del cuerpo vertebral de las últimas vértebras dorsales y primeras lumbares, así como un absceso en el músculo psoas, combinación muy sugestiva de tuberculosis (Zink *et al*, 2003).

Parece bastante probable la hipótesis de que el mismo Amenophis IV y su esposa Nefertiti murieran de esta enfermedad, e incluso se apunta a la existencia de un hospital para tuberculosos en el Egipto del año 1000 a. c. (auténtico precursor de los sanatorios del siglo XIX).

En el papiro Ebers, importante documento médico egipcio datado en el año 1550 a.C., se describe una consunción pulmonar asociada a adenopatías cervicales que muy bien podría ser la primera descripción del cuadro clínico de la

Figura 4: Papiro Ebers



tuberculosis pulmonar.

El término tisis/consunción aparece por primera vez en la literatura griega, alrededor del 460 a. c. Hipócrates (siglo V a. c. - siglo IV a. c.) identifica la tisis como la causa más frecuente de enfermedad de su tiempo. La describió entre la población de 18 a 35 años, siendo casi siempre fatal, llegando incluso a prevenir a los médicos de visitar a pacientes con tisis para salvaguardar su reputación. Observa una relación estadística entre padres e hijos con la enfermedad, por lo que le atribuye un patrón hereditario. Propone una teoría etiológica sobre la base de un exceso de flema en los pulmones procedente del cerebro (García *et al*, 1983).

Dice Hipócrates de esta enfermedad que:

"...un tísico viene de otro tísico y prende más fácilmente en ciertos temperamentos, como pituitosos, flemáticos e imberbes rubios de ojos brillantes, carnes blandas y omóplatos sobresalientes"

Hipócrates (padre de la medicina moderna)

Fue Aristóteles quien propuso por primera vez la posibilidad de contagio a través de la respiración.

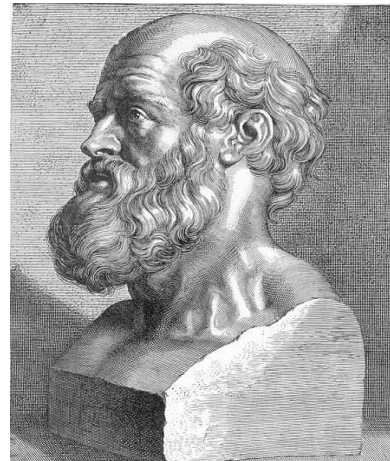


Figura 5: Busto de Hipócrates

Lucrecio (98-55 a. c.), en su "*De la naturaleza de las cosas*" propone un axioma cuya popularidad se extendería hasta el Renacimiento: La tisis es difícil de diagnosticar y fácil de tratar en sus primeras fases, mientras que resulta fácil de diagnosticar y difícil de tratar en su etapa final. Maquiavelo repetirá estas mismas palabras casi dieciséis siglos más tarde.

1.2. EDAD MEDIA Y RENACIMIENTO

Durante la Edad Media no se produjo ningún avance en el conocimiento de la tuberculosis. Dentro de la concepción teocentrista propia de este periodo se van introduciendo terapias alternativas de carácter sobrenatural. A los reyes se les atribuyen propiedades mágico-curativas: Felipe el Hermoso o San Luis de Francia entre otros tocaban las úlceras de los enfermos pronunciando las palabras rituales "El rey te toca, Dios te cura" (*Le Roy te touche, et Dieu te guérit*). Enrique IV se prodigó especialmente en este tipo de ceremonias, aunque, bien por suerte, o porque murió asesinado, no existe constancia de que contrajera la enfermedad. La popularización de este tipo de ritos sanadores acabó por rebautizar a la escrófula-tuberculosis como "*mal du roi*" en Francia, o "*king's evil*" en Inglaterra (Keers, 1978)



Figura 6: Enrique IV de Francia tocando a numerosos enfermos durante la ceremonia del "Toque Real"

1.3. SIGLOS XVII Y XVIII

En 1839 Johann Lukas Schönlein, profesor de medicina en Zurich, propone por primera vez el vocablo "tuberculosis" (por los tubérculos pulmonares asociados a la enfermedad conocida hasta entonces como tisis).

La incidencia de tuberculosis va aumentando progresivamente durante la Edad Media y el Renacimiento, desplazando a la lepra, hasta alcanzar su máxima extensión desde el siglo XVIII y hasta finales del XIX, en el contexto de los desplazamientos masivos de campesinos hacia las ciudades en busca de trabajo. La revolución industrial supone al mismo tiempo un problema (hacinamiento, pobreza, jornadas de trabajo interminables, viviendas en condiciones de humedad y ventilación muy propicias a la propagación de gérmenes) y una solución: es el momento del despegue de la medicina científica (Bateman, 1779).

1.4. SIGLO XIX: LA ENFERMEDAD ROMÁNTICA



Figura 7: Laennec en el Hospital Necker, por Théobald Chartran.

La tuberculosis fue bautizada durante este periodo como la plaga blanca, "mal de vivir" o "*mal du siècle*". El ideal de belleza romántica lleva a muchas mujeres del siglo XIX a seguir estrictas dietas de vinagre y agua, con objeto de provocarse anemias hemolíticas que las empalidezcan.

Se mitifica la enfermedad, el aspecto etéreo, pálido, casi fantasmal del enfermo de tuberculosis representa a la perfección ese ideal e incluso se propaga la creencia de que su padecimiento provoca "raptos" de creatividad o euforia denominados "*Spes phtisica*", más intensos a medida que la enfermedad avanza, hasta el punto de producirse una fase final de creatividad y belleza supremas justo antes de la muerte.

En 1869 Jean Antoine Villemin demuestra que puede contagiarse la enfermedad, tras inocular material purulento de humanos infectados a conejos de laboratorio; y poco después, en 1882, Koch descubre el agente infeccioso que la provoca. Comienzan a proliferar los sanatorios especializados para tuberculosos, ubicados en regiones altas y soleadas, lo que supone por primera vez un obstáculo a la cadena de transmisión del microorganismo (Boehmer y Dettweiler fundan los primeros sanatorios en Alemania). En 1895 Wilhelm Röntgen descubre los rayos X, lo que permite diagnosticar y seguir la evolución de la enfermedad. Esto, junto con la mejora progresiva de las condiciones de vida, determina que los casos comiencen a disminuir, y aunque faltan casi cincuenta años para el hallazgo de un tratamiento farmacológico eficaz, la incidencia y mortalidad comienzan a caer.

Una de las figuras médicas más importantes de este siglo dedicadas al estudio de la fisiología es René Théophile Hyacinthe Laennec, que moriría de tuberculosis a los 45 años, contraída en el contexto de sus estudios con pacientes y cadáveres infectados; diseñó el estetoscopio y se afanó por corroborar que sus hallazgos auscultatorios se correspondían con lesiones (Laennec, 1819). Flüge, en los últimos años del siglo XIX, señala que las gotitas de saliva podían ser responsables de la infecciosidad, al permanecer en el aire por cierto tiempo (a partir de sus trabajos se comienzan a denominar gotas de Flüge a las partículas de saliva emitidas por la boca o la nariz de 0,5 a 10 μm de diámetro, capaces de permanecer hasta 30 minutos en suspensión y de propagar microorganismos al ser inhaladas por otros individuos).

1.5. ROBERT KOCH



R. Koch

Figura 8: Robert Koch

Los experimentos de Villemin confirmando la contagiosidad de la enfermedad (tras inocular por vía subcutánea material purulento a conejos) obligan a la comunidad médica a plantearse el hecho de que la tuberculosis es una infección específica y que su agente etiológico es transmisible. En 1882 un médico prusiano, Robert Koch, emplea un novedoso método de tinción con azul de metileno y marrón de Bismarck y lo aplica a muestras de esputo procedentes de pacientes con tuberculosis, revelándose por primera vez el agente causante de la enfermedad: el *Mycobacterium tuberculosis*, o bacilo de Koch, en su honor.

Tras varios intentos (no crece bien a temperatura ambiente) es capaz de incubarlo en suero sanguíneo coagulado. La prueba definitiva la obtiene inoculando cultivos puros de lo que él mismo ya denomina "bacilo tuberculoso" en conejos, y observando que todos ellos mueren con los mismos síntomas de la tuberculosis. Y de sus cadáveres puede obtener, de nuevo, cultivos del bacilo. Finalmente hace públicos sus resultados en la Sociedad Fisiológica de Berlín, el 24 de marzo de 1882, en una ponencia que titula *Über Tuberculose*. Desde entonces, en esa fecha se celebra cada año el **Día Mundial de la Tuberculosis** (Brock, 1988). Franz Ziehl y Friedrich Neelsen en Alemania, mejoran el método de tinción que a partir de entonces se conocerá como Tinción de Ziehl Neelsen. En 1908 el mismo Koch desarrolla la tuberculina en colaboración con el veterinario Camille Guérin (1872-1961) un derivado proteico purificado estándar del bacilo (también denominado Protein Purified Derivate [PPD]) que creía útil como agente inmunizante pero que Charles Mantoux depuraría posteriormente para administrar por vía intradérmica como método diagnóstico (su aplicación intradérmica, habitualmente del antebrazo, genera una respuesta inmunitaria diferente en el huésped si este ha estado en contacto previo con el bacilo tuberculoso que si no lo ha hecho).

"De aquí en adelante no tendremos más frente a nosotros a una cosa vaga e indeterminada, estamos en presencia de un parásito visible y tangible. Se desarrolla en el hombre y con cegar las fuentes de donde viene la infección, y una de ellas es seguramente la expectoración, la lucha antituberculosa será un hecho". Über Tuberculose. Koch, R. Final de la conferencia ante la Sociedad Fisiológica de Berlín, 1882

1.6. EL SIGLO XX

El siglo XX comienza con un interés renovado por la enfermedad, a la luz de los nuevos descubrimientos que ha dejado el anterior. En 1902 se constituye en Berlín la *Conferencia Internacional de Tuberculosis*, en la que se propone como símbolo la cruz de Lorena. Durante las primeras décadas se producen algunos avances en el tratamiento quirúrgico de pacientes con tuberculosis y proliferan en Europa las campañas sanitarias orientadas al control de la propagación de la enfermedad. En 1921, Albert Calmette y Camille Guérin producen la vacuna contra la Tuberculosis el Bacilo de Calmette y Guérin (BCG), empleando una variante atenuada del *Mycobacterium bovis*. En 1944, en plena Guerra Mundial, Albert Schatz y Selman Waksman descubren a partir de lo que se consideraba un pequeño hongo capaz de inhibir el crecimiento del *Mycobacterium* (denominado *Streptomyces griseus*) la estreptomicina. Por este descubrimiento, S Waksman recibirá el premio Nobel de Medicina. La estreptomicina presentaba una eficacia limitada pero superior a los tratamientos empleados hasta ese momento. Sin embargo, la verdadera revolución se produce algunos años después, en 1952, con el desarrollo de la isoniacida (hidracina del ácido isonicotínico), el primero de los antibióticos específicos que conseguirá convertir a la TB en una enfermedad curable en la mayoría de los casos. La aparición de la rifampicina en la década de los sesenta acortó notablemente los tiempos de curación, lo que hizo disminuir el número de casos nuevos de manera importante hasta la década de los ochenta.

En 1981 hace su aparición otra enfermedad: el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cuya principal característica es debilitar el sistema inmunitario de los sujetos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Pronto alcanza la categoría de pandemia, lo que resulta un terreno abonado para el rebrote de enfermedades que se creían en retroceso, entre ellas la tuberculosis. Este hecho, una intensificación de las migraciones masivas Sur-Norte y unas condiciones mantenidas (e incluso agravadas) de pobreza en muchos países subdesarrollados (principalmente en Asia y África) fueron abonando el terreno para que en 1993 la Organización Mundial de la Salud declara a la tuberculosis "emergencia mundial".

El tratamiento actual contra la tuberculosis consiste en una combinación de varios antibióticos específicos (isoniacida, rifampicina, pirazinamida, etambutol) durante un período que no suele ser inferior a seis meses. Esto ha determinado (por motivos culturales, sociales, económicos...) que la adherencia y el cumplimiento del tratamiento haya sido incompleto o parcial en muchos casos provocando la aparición de numerosas cepas de *M. tuberculosis* resistentes a dichos antibióticos.

En 1985 la OMS comienza una campaña masiva de vacunación para inmunizar a cada niño en el mundo contra tos ferina, tétanos, polio, tuberculosis, sarampión y difteria.

En 1998 se publica en la revista *Nature* el genoma completo de *Mycobacterium tuberculosis*, concretamente de la cepa-tipo de referencia de laboratorio H37Rv (http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/B_Rilova/Copia%20de%20proyectoBIO/SECUENCIACION/secuenciacion.htm).

1.7. SIGLO XXI

Tras la erradicación de la viruela y prácticamente la de la poliomielitis en el siglo XX, la Organización Mundial de la Salud se ha planteado como objetivo para el siglo XXI la erradicación de la tuberculosis. Sin embargo, dos factores han recortado los planes para la consecución de este objetivo: por un lado el aumento de casos asociados a infección por VIH desde la década de los noventa (hasta volver a ser considerada una pandemia mundial); y la aparición de una cepa resistente a todos los fármacos empleados hasta el momento: la XDR-TB (extremely drug resistant tuberculosis) detectada por primera vez a comienzos de 2006. La mayor incidencia de esta cepa se ha detectado en las antiguas repúblicas de la Unión Soviética y en Asia, siendo de especial gravedad su presencia en África, donde la alta incidencia de SIDA agrava la situación. En 2007 la OMS estima que el 2% de todos los nuevos casos de tuberculosis (unos 180.000) presentan esta nueva cepa.

En la actualidad se han secuenciado completamente los genomas de al menos 6 miembros del complejo *M. tuberculosis* y están en fase de secuenciación más de 40 genomas de otras tantas cepas de *M. tuberculosis* (<http://www.genomesonline.org>). Varias de estas cepas son de tipo MDR o XDR lo que será un primer paso para la elaboración de nuevos tratamientos específicos más eficaces.

Actualmente, dentro de las líneas de investigación en marcha, conducentes a un mejor control de la enfermedad, destacan aquellas dirigidas a mejorar la detección (Manuel & Kumar, 2008) y el tratamiento de la tuberculosis latente, dado que, hasta el momento, los esfuerzos realizados han dado resultados importantes pero aún de éxito limitado (Singh *et al*, 2008).



Figura 9: Cruz de Lorena, símbolo internacional de la lucha contra la tuberculosis

2.- LA TUBERCULOSIS Y LA CULTURA

Dada su amplia distribución en la población, la tuberculosis afectó a numerosas figuras del mundo de la cultura, por lo que se acabó convirtiendo en un tópico o subgénero recurrente en el arte, principalmente en la literatura, la pintura y el cine, durante el siglo largo que duró el período de mayor extensión y mortalidad de la enfermedad.

Aunque la endemia castigó preponderantemente a la población urbana de menores recursos, las clases acomodadas no escapaban al contagio, y una larga lista de personalidades destacadas se vio afectada por el mal: poetas como Lord Byron, Shelley, Keats o Bécquer; músicos del talento de Chopin, Paganini o Weber; pintores como Watteau y Modigliani. No sólo los artistas fueron víctimas célebres del *Mycobacterium tuberculosis*. Laennec, a quien se deben las descripciones más detalladas de esta sintomatología, murió de tuberculosis pulmonar, lo mismo que Bichat. Simón Bolívar, el libertador latinoamericano, alternó sus campañas militares con los embates de la enfermedad, y finalmente sucumbió a la misma, al igual que Napoleón II, duque de Reichstadt, hijo del gran corso y de María Luisa de Austria (Vaccarezza, 1981)

2.1. LITERATURA

La literatura romántica reflejó las vivencias de la sociedad europea frente a lo que se dijo en llamar la "peste blanca". El romanticismo rescató lo tétrico y fantasmal, las heroínas lánguidas y semitransparentes, y en ese ambiente la tuberculosis más que una enfermedad llegó a ser una moda. Algo parecido a lo que la anorexia ha representado en el siglo XX.

En 1848 Henri Murger, un escritor y periodista francés que había sido secretario de Tolstoi, publicó *Escenas de la vida bohemia*. La obra relata las ilusiones, amores y sufrimientos de un grupo de artistas y estudiantes parisinos, de los cuales Rodolfo, el protagonista, es un *alter ego* de Murger (que morirá de esta enfermedad en 1861). Mimí, la heroína, una *grisette* parisina que compartió alegrías y penurias con Rodolfo, termina sus días como "el número ocho" de una sala de mujeres del *Hôpital de la Pitié*, esperando en vano el ramo de violetas que su amante no le pudo comprar. Medio siglo después, el libreto inspiraría a Giacomo Puccini para componer *La Bohème*, una de las óperas más representadas de la historia.

Unos meses después de *Escenas de la vida bohemia* salió a la venta *La dama de las camelias*, de Alejandro Dumas hijo. Margarita Gautier, es el prototipo de languidez femenina atribuida a la tisis. Este personaje, está inspirada en Marie Duplessis (de nombre real Alphonsine Plessis), amante de Dumas y enferma de tuberculosis. Su tumba se halla en el Cementerio de Montmartre, en París. Así como Henri Murger se disfrazó de Rodolfo, Armando

Duval, representaría al escritor Alejandro Dumas. Giuseppe Verdi se interesa por la obra, a partir de la cual compone *La Traviata*.

La trayectoria vital de estas dos heroínas es un buen ejemplo de las imágenes que la sociedad decimonónica construyó a partir de su contacto con el *Mycobacterium tuberculosis*, y a las que asoció con el desarrollo de la enfermedad. La pobreza, la mala alimentación y el agotamiento, por un lado. La promiscuidad y la vida disipada por el otro.

Uno de los episodios más rocambolescos lo protagoniza el dramaturgo francés Jean-Baptiste Poquelin (Molière): enfermo de tuberculosis muere tras sufrir en el escenario una hemoptisis masiva, mientras representa una de sus obras ("El enfermo imaginario", basada en su propia experiencia vital) en un retruécano biográfico digno de su genio. Tras su fallecimiento se extiende la superstición entre el gremio de actores de que salir a escena vestido de amarillo (como lo estaba Molière en dicha actuación) trae mala suerte.

La novela de los siglos XIX y XX brinda numerosos ejemplos de la influencia de la tuberculosis en el pensamiento cultural: *La montaña mágica*, de Thomas Mann, relata las vivencias de un paciente ingresado en un sanatorio para tuberculosos. En la literatura rusa del siglo XIX pueden encontrarse numerosos ejemplos de personajes de novela con tuberculosis, aunque el autor más recurrente en este aspecto es Fiódor Dostoyevski: Katerina Ivanovna en *Crimen y castigo*, Kirillov en *Los endemoniados*, o Ippolit y Marie en *El idiota* padecen esta enfermedad.

En la novela de John Le Carré *El jardinero fiel* así como en la película homónima de Fernando Meirelles, se desarrolla una trama alrededor de las pruebas para un fármaco antituberculoso realizadas por una multinacional farmacéutica en África y desarrolla el tema de una posible pandemia mundial de tuberculosis debida a la aparición de cepas muy resistentes a los tratamientos antibióticos conocidos hasta el momento.

Camilo José Cela, Nobel de literatura en 1989 describe en su segunda novela, *Pabellón de reposo* (1943), sus vivencias durante el tiempo que vivió en un sanatorio para tuberculosos (*Sendrail*, 1981)

2.2. PINTURA

Sandro Botticelli retrata en pleno renacimiento el ideal de mujer pálida, lánguida, casi etérea que abanderará siglos después el movimiento romántico. En varios de sus cuadros reproduce los rasgos de una amante florentina, Simonetta Vespucci, aquejada de tuberculosis.



Figura 10: *La primavera*.
El nacimiento de Venus

María del Pilar Teresa Cayetana de Silva y Álvarez de Toledo, la Duquesa de Alba supuestamente retratada por Goya en *La maja desnuda*, padecía en el año 1796 de tuberculosis y dengue, por lo que no parece probable que se trate del modelo de dicho cuadro (Hughes, 2005).

Edward Munch, pintor noruego, icono de un tipo de arte cargado de angustia existencial, perdió, siendo aún muy niño, a su madre y a una hermana aquejadas de tuberculosis. Esta experiencia parece estar en el origen del peculiar estilo de su obra.



Figura 11: *El grito* de Edward Munch

3.- CARACTERÍSTICAS Y TAXONOMÍA DE LAS MICOBACTERIAS

3.1. EL GÉNERO *MYCOBACTERIUM*

El género *Mycobacterium* fue propuesto por Lehmann y Neumann en 1896 para agrupar al bacilo tuberculoso y al bacilo leproso. Desde el punto de vista taxonómico el género *Mycobacterium* pertenece a la clase *Actinobacteria*, al orden *Actinomycetales* y a la familia *Mycobacteriaceae*. Forman parte de él más de 100 especies diferentes, la mayoría de ellas de vida libre en el agua o en el suelo, aunque algunas de las más patógenas tienen su nicho ecológico exclusivamente en el ser humano y también en ciertos animales de sangre caliente (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*) (Goodfellow *et al*, 1998).

Las micobacterias son microorganismos aerobios estrictos o microaerófilos, inmóviles, no formadores de esporas. Son muy resistentes a la desecación, se destruyen con la pasteurización y son más resistentes a la desinfección con productos químicos que otros microorganismos no formadores de esporas debido a la cubierta hidrofóbica rica en lípidos que poseen, siendo sensibles al calor húmedo y a la luz ultravioleta. Son también muy resistentes a la acción de ácidos y álcalis, propiedad importante que permite la utilización de este tipo de sustancias en los procesos de descontaminación y procesamiento de muestras clínicas.

Pueden variar en su morfología, aunque la mayoría poseen una forma bacilar, ligeramente curvada y con un tamaño que oscila entre 0,2-0,7 μm de grosor y 1-10 μm de longitud (Goodfellow *et al*, 1998).

Son bacterias de crecimiento lento, con tiempos de generación que oscilan de 2 horas a más de 20 horas, por lo que la aparición de colonias visibles en los medios de cultivo sólido puede ocurrir entre los 2 días y las 8 semanas de incubación. En función de su velocidad de crecimiento se dividen en dos grupos: micobacterias de crecimiento rápido (requieren menos de 1 semana para que se visualicen colonias en medio sólido) y micobacterias de crecimiento lento (precisan de más de una semana). La mayoría de ellas se desarrollan de forma adecuada en medios simples que contengan una única fuente de carbono, una fuente de nitrógeno e iones de metales esenciales como el hierro o el magnesio. Sin embargo para el aislamiento primario a partir de muestras clínicas se requiere un medio más complejo que contenga una base de patata-huevo (Löwenstein-Jensen) o una base de agar-suero (Middlebrook).

Pueden formar colonias blanquecinas o bien coloreadas (amarillas, naranjas o a veces rosadas) debido a pigmento carotenoides. Algunas especies necesitan la presencia de luz para producir pigmento (denominándose por esta razón fotocromógenas), mientras que otras son capaces de producir pigmento indistintamente en ausencia o presencia de luz (por lo que se llaman

escotocromógenas). La morfología de las colonias varía según la especie, pudiendo aparecer colonias lisas, rugosas, tanto pigmentadas como carentes de pigmento.

3.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

3.2.1 Estructura General

La envoltura de las micobacterias es uno de los componentes más característicos del género; otorga propiedades específicas a sus miembros, participando en los mecanismos patogénicos durante su interacción con el hospedador; así como en la resistencia a agentes antibacterianos y en la adquisición de nutrientes. También determina aspectos específicos del cultivo y crecimiento de estas bacterias. La envoltura está constituida por la cápsula, la pared celular y la membrana citoplasmática (Rastogi *et al*, 2001).

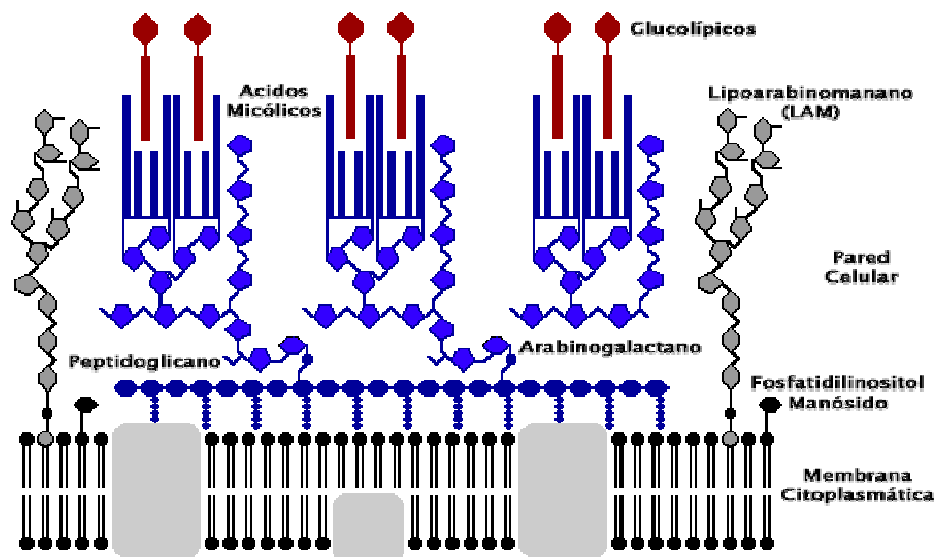


Figura 12: Esquema de la pared de las Micobacterias

3.2.1.1 Cápsula

Estudios iniciales de la interacción micobacteria-macrófago revelaron la presencia de una estructura capsular o una zona transparente a los electrones, de 70 a 100 nm de grosor, que protege a la micobacteria de los mecanismos defensivos del hospedador. En el caso de micobacterias patógenas, la síntesis de material capsular está controlada parcialmente por mecanismos reguladores dependientes del huésped. La cápsula varía de acuerdo a la especie micobacteriana. Está constituida por proteínas y polisacáridos, que forman una matriz que se enriquece de lípidos a medida que se acerca a la pared celular (Ortalo-Magne *et al*, 1996). Han sido caracterizados numerosos lípidos de la cápsula en diferentes especies de micobacterias entre los que se encuentran

fosfolípidos, sulfolípidos y dimicolato de trehalosa. Este último es el lípido más estudiado de la cápsula, contiene ácidos micólicos del mismo tipo que los que se encuentran localizados en la pared celular (Rastogi *et al*, 2001). La cápsula micobacteriana participa en la capacidad de formar biopelículas que se ha descrito recientemente en varias especies del género, incluida *M. tuberculosis* (Yamazaki *et al*, 2006, Ojha *et al*, 2008).

3.2.1.2. Pared Celular

La pared celular de las micobacterias presenta un elevado contenido de lípidos (30-40% de su peso total) especialmente en ácidos micólicos (Rastogi *et al*, 2001). Este alto contenido en lípidos las hace impermeables a los colorantes empleados en la tinción de Gram y su apariencia tras esta tinción puede ser variable. Aunque clásicamente se las considera gram positivas, la composición de su pared difiere de la característica de las bacterias Gram +. Para su observación microscópica se utilizan tinciones que favorecen la captación del colorante (Ziehl-Neelsen) y una vez captado éste, no pueden decolorarse, incluso con alcohol-ácido. Esta imposibilidad de decolorarse se denomina ácido-alcohol resistencia. La pared celular está conformada por una matriz insoluble compuesta de 3 macromoléculas unidas de forma covalente: el peptidoglicano, el arabinogalactano y los ácidos micólicos.

El peptidoglicano está unido covalentemente al arabinogalactano que es un heteropolisacárido, el cual está unido a su vez a ácidos micólicos de alto peso molecular (de 60 a 90 carbonos) (Kremer *et al*, 2002). Además de esta matriz, existen lípidos complejos formando parte de la pared celular.

3.2.1.3 Membrana Citoplasmática

La membrana citoplasmática de las micobacterias no difiere mucho de la membrana de las otras bacterias. Está constituida por proteínas unidas a una bicapa lipídica, conteniendo fosfolípidos como los fosfatidil-inositol-manósidos, que son comunes a otras bacterias del orden *Actinomycetales*. El lipoarabinomano es un polisacárido presente en todas las especies de micobacterias que se encuentra unido a un fosfo-inositol de la membrana. Desde su anclaje en la membrana citoplasmática atraviesa la pared bacteriana formando también parte de su composición. Los extremos del lipoarabinomano, en especies de micobacterias de crecimiento lento, pueden estar conformados por residuos de manosa; mientras que en micobacterias de crecimiento rápido está conformado por residuos de fosfatidil-inositol (Daffe *et al*, 1998).

3.2.2 Metabolismo

Las micobacterias son microorganismos aerobios estrictos y quimioorganotrofos, catalasa positivos. Oxidan la glucosa y el glicerol a CO₂ y H₂O (Goodfellow *et al*, 1998; Wayne *et al*, 1986), utilizando el glicerol como

fuentes de carbono y energía, a excepción de *M. bovis* que es glicerofóbico y utiliza piruvato. Como fuentes de nitrógeno pueden utilizar asparagina, glutamato y amonio.

Las micobacterias son prototrofas para todos los aminoácidos, purinas y pirimidinas y vitaminas del complejo B. Crecen en medios de cultivo especiales con base de huevo, como Löwenstein Jensen, Ogawa kudoh o medios con base agar como Middlebrook 7H10 o 7H11. A los medios de cultivo se les suelen agregar suplementos tales como: ácido oleico, albúmina dextrosa o micobactina. También crecen en medios líquidos como Dubos Tween Albúmina, Middlebrook 7H9, etc (Koneman *et al*, 1999).

3.2.3 Genoma

Actualmente se conocen las secuencias completas de varios genomas de diferentes cepas de *M. tuberculosis* (por ejemplo la cepa tipo H37Rv (Cole *et al*, 1998) y un aislado clínico CDC 1551 (Fleischmann *et al*, 2002), y de otras especies del género, como se ha mencionado en el apartado "Historia de la Tuberculosis".

El genoma micobacteriano es un genoma circular, tiene un alto contenido de G+C, constituyendo entre el (62 al 76% del contenido total de bases según la especie (Baess *et al*, 1978). El genoma de *M. tuberculosis* ha sido el más estudiado, tiene un contenido G+C de 65.5% y su longitud total es de 4411 kb (que codifican para 3959 genes y 6 pseudogenes) (Cole *et al*, 1998). La secuencia del genoma de *M. leprae* tiene 3268 kb (1604 genes y 1116 pseudogenes) siendo su contenido G+C de 57.8%. Solamente el 49.5% del genoma de *M. leprae* tiene genes que codifican proteínas (frente al 90.8% de *M. tuberculosis*) y el 27% contiene pseudogenes. Esta disminución en la capacidad codificante se considera la causa de que *M. leprae* sea un patógeno intracelular estricto incapaz de ser cultivado *in vitro* en medios sintéticos.

La comparación de secuencias en los genomas de diferentes cepas del complejo *M. tuberculosis* permite la diferenciación en 3 grupos genotípicos, en base al polimorfismo de secuencias de genes conservados (Sreevastan *et al*, 1997). Uno de los grupos engloba diferentes miembros del complejo (*M. bovis* y *M. microti* p.ej). Los otros dos grupos están formados por distintas cepas de *M. tuberculosis*. Por su parte, Brosh propuso una ruta evolutiva del complejo que se delinea según la presencia o ausencia de regiones de delección. La casi total ausencia de regiones de delección en *M. canettii* apoya su designación como cepa ancestral en el complejo (Brosh *et al*, 2002).

3.3. TAXONOMÍA

Las diversas especies que forman parte del género *Mycobacterium* se clasificaron clásicamente en 5 grupos (clasificación de Runyon, 1953) de acuerdo a la velocidad de crecimiento y a la producción o no de pigmento. La clasificación de Runyon ha entrado en desuso, aunque publicaciones recientes siguen refiriéndose a ella.

A excepción de *Mycobacterium leprae* que no se ha podido cultivar *in vitro*, pero que *in vivo* tiene un tiempo de generación de 14 días, las micobacterias pueden ser asignadas a 2 grupos taxonómicos, basados en la velocidad de crecimiento de diferentes especies (Goodfellow *et al*, 1998).

a) Micobacterias de crecimiento lento: Agrupa a las especies que tardan más de 7 días en dar colonias visibles en medios de cultivo sólidos. Las micobacterias patógenas pertenecen en general a este grupo.

b) Micobacterias de crecimiento rápido: Agrupa a las especies que tardan menos de 7 días en dar colonias visibles en medios de cultivo sólidos. La mayor parte de las micobacterias saprofitas pertenecen a este grupo.

Recientemente, se ha subdividido el género en 4 grupos, atendiendo a características presentes en la región genómica que codifica para el RNA ribosómico (Menendez *et al*, 2002). La división está basada en el número de operones ribosómicos por genoma y en la longitud de la hélice 18 del rRNA 16S. Los grupos de esta clasificación son los siguientes:

- **I-l.** Especies que presentan un operón ribosómico por genoma y una hélice 18 larga (ej.: *M. leprae* y *M. tuberculosis*).
- **I-s.** Especies que presentan un operón ribosómico por genoma y una hélice 18 corta (ej.: *M. chelonae* y *M. abscessus*).
- **II-l.** Especies que presentan dos operones ribosómicos por genoma y una hélice 18 larga (ej.: *M. celatum* y *M. terrae*).
- **II-s.** Especies que presentan dos operones ribosómicos por genoma y una hélice 18 corta (ej.: *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. porcinum* y *M. smegmatis*).

La secuenciación del gen codificante para el RNA ribosomal se ha convertido en el método molecular de referencia en la diferenciación de micobacterias. Este método ha permitido demostrar que existe una base evolutiva en la diferenciación de micobacterias de acuerdo a su velocidad de crecimiento, no existiendo dicha base para la diferenciación según el tipo de pigmentación. El gen rRNA 16S (*rrs*) es un gen muy conservado, compuesto por una secuencia de aproximadamente 1.500 nucleótidos. Está formado por

regiones conservadas y por regiones variables localizadas en zonas específicas de su secuencia.

MODELO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL RNA 16S

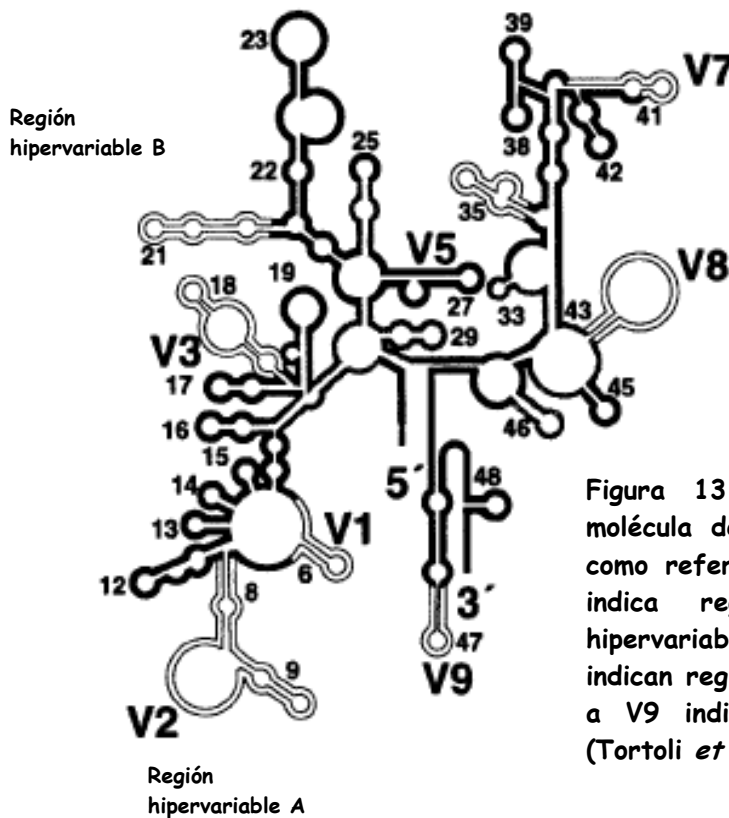


Figura 13: Corresponde a la molécula de *E. coli* que se usa como referencia. La doble línea indica regiones variables o hipervariables; las líneas grises indican regiones conservadas; V1 a V9 indican zonas variables. (Tortoli *et al*, 2003)

Las micobacterias también pueden clasificarse en función de su interés clínico. Según este último criterio, se pueden dividir en tres grupos (Falkinham *et al*, 1996; Inderlied *et al*, 1993; Rastogi *et al*, 2001):

- **Complejo tuberculosis:** que incluye las especies causantes de tuberculosis humana y animal, como *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. bovis* BCG y *M. microti*. Más recientemente se han descrito dos nuevos miembros del complejo: *M. caprae* y *M. pinnipedii*, así como la cepa ancestral *M. canettii*.
- **Complejo lepra:** que incluye a *M. leprae* (agente productor de la lepra humana) y *M. lepraemurium* (responsable de la lepra en roedores).
- **Micobacterias no tuberculosas,** también conocidas como micobacterias atípicas o micobacterias diferentes a tuberculosis: en este apartado quedan incluidas el resto de las especies. Algunas de ellas pueden ser patógenas para el ser humano (*M. avium* complex, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. marinum*, *M. fortuitum* complex) y otras son generalmente saprofitas o bien patógenas oportunistas (*M. gordonae*, *M. terrae* complex).



Figura 14: Ciencia y Caridad (Pablo Ruiz Picasso, 1897)

4.- CLÍNICA DE LA TUBERCULOSIS

4.1. TRANSMISIÓN Y PATOGENIA

La transmisión de *M. tuberculosis* se produce por vía aérea. En casi todos los casos la infección tuberculosa se adquiere por la inhalación de bacilos tuberculosos contenidos en pequeñas partículas (1-5 μ) capaces de alcanzar el alvéolo. Para considerar a un paciente infeccioso por vía aérea, éste debe padecer TB pulmonar y expulsar partículas que contengan bacilos en su interior. Una vez que las secreciones respiratorias se expelen desde la nariz o la boca, su contenido acuoso se evapora muy rápidamente, dejando tan sólo un pequeño residuo de material sólido, el núcleo goticular, en cuyo interior existen muy pocos microorganismos infectantes. Estos núcleos goticulares pueden mantenerse y transportarse por el aire durante un largo período de tiempo.

Un único bacilo en un diminuto núcleo goticular es más peligroso que un gran número de bacilos en una partícula de mayor tamaño, porque esas grandes partículas no permanecen aerosolizadas y, si se inhalan, se depositan en las paredes de la tráquea y del resto de la vía aérea superior. Allí son atrapadas en la capa de moco y eliminadas hacia la orofaringe, desde donde bien son deglutidas, o bien expectoradas. Los microorganismos depositados en la piel o las mucosas intactas no invaden los tejidos y, por tanto, no son infectantes. El potencial de infectividad de un paciente con TB depende, fundamentalmente, de 4 factores:

1. Severidad y frecuencia de la tos.
2. Carácter y volumen de las secreciones.
3. Número de bacilos de la fuente de infección (los pacientes con baciloscopia positiva son los más infectantes).
4. Uso de la quimioterapia (después de 2 semanas de tratamiento, se produce una reducción en el número de bacilos cercana al 99%).

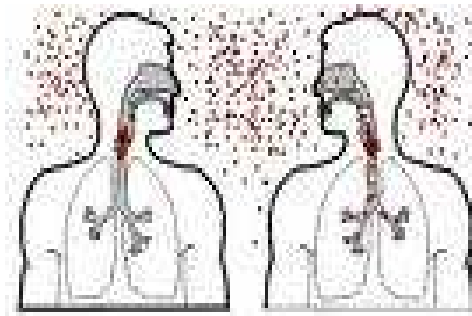


Figura 15: Transmisión aérea

Además, existen otros factores que pueden influir en la transmisión, como son los factores ambientales (ventilación de la habitación del enfermo, uso de mascarillas por el paciente, etc.), y los condicionantes de la exposición (cercanía al enfermo y tiempo).

Además de la vía aérea, existen otros mecanismos de transmisión, mucho menos frecuentes, como son la vía digestiva, la vía urogenital, la vía cutáneo-mucosa y raramente la vía transplacentaria.

Cuando una persona se infecta por *M. tuberculosis*, desencadena en su organismo una respuesta inmunitaria, mediada por células, que se desarrolla en un tiempo que oscila entre 2 y 10 semanas y se revela por la aparición de una reacción tuberculínica positiva. Los macrófagos en primera instancia y los linfocitos T después consiguen, en la mayoría de los casos, detener la multiplicación de los bacilos, aunque, en un pequeño porcentaje de infectados (5%), esta inmunidad será insuficiente para impedir el desarrollo de la enfermedad y se producirá la denominada TB primaria (Andersen *et al*, 2000)

Incluso si se consigue controlar la infección, no todos los bacilos de la población inicial son destruidos, sino que algunos de ellos son capaces de persistir intracelularmente en estado de latencia y, por ello, en otro 5% de los infectados, tras el paso de meses o años, podría producirse la enfermedad por reactivación endógena denominándose TB post-primaria.

No todas las personas corren el mismo riesgo de desarrollar enfermedad tuberculosa tras la infección. Los principales factores de riesgo conocidos son la infección por el VIH, la silicosis, la diabetes mellitus, las enfermedades y fármacos inmunosupresores, la terapéutica prolongada con corticoides, la gastrectomía y los estados de desnutrición. La susceptibilidad también está incrementada en los cinco primeros años de vida, la pubertad, la adolescencia y en la edad avanzada (American Thoracic Society, 2000).

INMUNOPATOGÉNESIS DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR

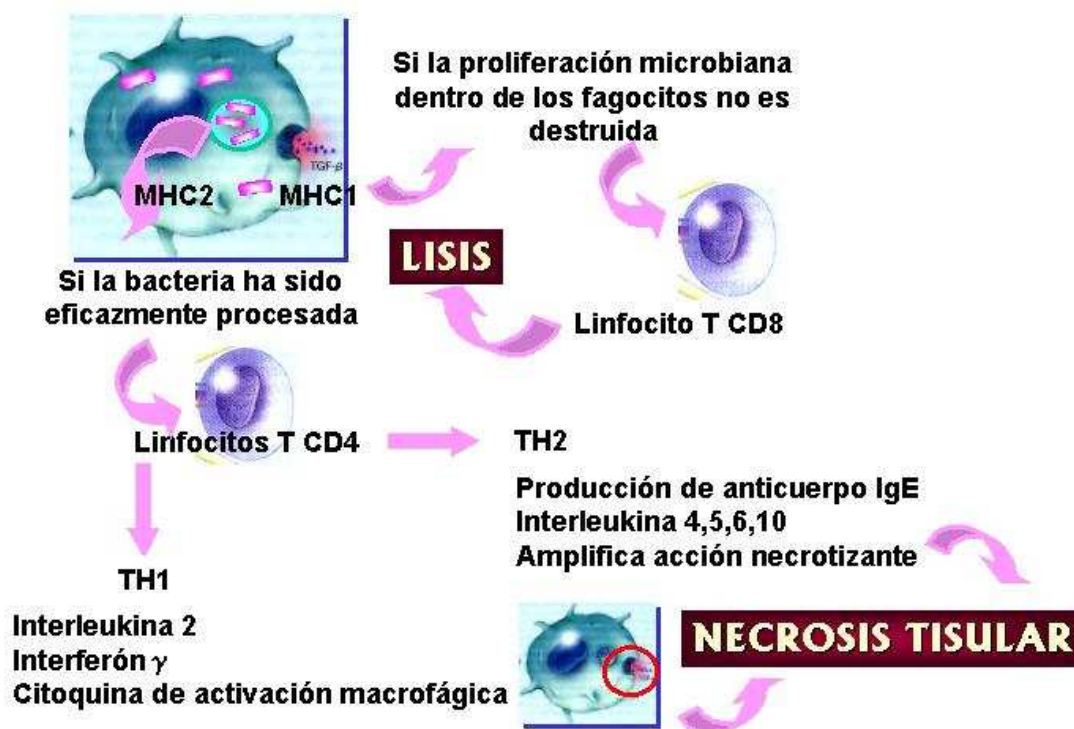


Figura 16: Inmunopatogénesis de la tuberculosis pulmonar

4.2. DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA

Es tan importante diagnosticar la infección como la enfermedad, ya que ambas sólo son dos pasos sucesivos de la agresión que *M. tuberculosis* efectúa al organismo humano e implican actitudes terapéuticas en forma de profilaxis o de tratamiento.

4.2.1 Prueba de la tuberculina

El diagnóstico clínico de la infección tuberculosa se basa tradicionalmente en el resultado de la prueba de la tuberculina (PT). Ésta pone de manifiesto un estado de hipersensibilidad del organismo frente al bacilo tuberculoso, que se adquiere, la mayoría de las veces, después de una infección producida por *M. tuberculosis*, aunque también puede ser ocasionado por vacunación BCG o más raramente por infección por otras micobacterias (Jasmer *et al*, 2002).

Con la PT se pone de manifiesto una respuesta inmunológica mediada por células, que da lugar a una reacción inflamatoria con una importante infiltración celular en la dermis, lugar donde es depositada la tuberculina. Esta respuesta se

puede detectar mediante una induración visible y palpable de la zona cutánea donde se practicó la prueba. Se puede acompañar de edema, eritema y a veces vesiculación, necrosis y linfadenitis regional (Richeldi, 2006).



Figura 17: Prueba de la tuberculina

La PT está indicada en todas las situaciones en que interese confirmar o descartar la infección tuberculosa, y no existen contraindicaciones para la misma. Debe practicarse, por su reproducibilidad y precisión, según la técnica de Mantoux, que consiste en la administración de la tuberculina por vía intradérmica en la cara anterior del antebrazo (aunque también se puede aplicar en la cara posterior) lejos de las venas y en piel libre de lesiones (Huebner *et al*, 2003)

La lectura se realizará a las 72 horas, midiendo en milímetros la induración que se obtenga en la zona de la inyección y haciendo la medición según el diámetro transversal al eje longitudinal del antebrazo. Sólo hay que medir los límites de la induración y, si sólo hay eritema sin induración, el resultado se registrará como 0 mm. En el caso de que la lectura no se pueda realizar a las 72 horas, también será válida si se efectúa antes de los 7 días (Pina *et al*, 2002).

Se considerará que una PT es positiva cuando presente una induración igual o mayor de 5 mm, límite aceptado actualmente para nuestro país. Tras la infección por *M. tuberculosis* tienen de transcurrir de 2 a 12 semanas para que los linfocitos T sensibilizados hayan pasado al torrente circulatorio y puedan reconocer la tuberculina depositada en la dermis.

La capacidad de respuesta a la tuberculina no permanece invariable durante toda la vida y, aunque no llega a desaparecer, se puede debilitar con el tiempo. Incluso puede llegar a dar un resultado negativo en pacientes de edad avanzada que se infectaron en su juventud o en vacunados no infectados por *M. tuberculosis*, teniendo en cuenta que en vacunados la respuesta se debilita más rápidamente.

En estos casos, para detectar el denominado efecto *booster* (empuje) se volverá a practicar una nueva prueba 7-10 días después, y será el resultado de esta segunda PT el que indique si esa persona ha presentado o no reacción. El efecto *booster* consiste en la estimulación de una sensibilidad tuberculínica debilitada, por la tuberculina empleada en la PT cuyo resultado es aparentemente negativo. Tras esta PT, la capacidad de respuesta a la tuberculina estimulada se pone de manifiesto al cabo de una semana y puede persistir 2 o más años, por lo que una nueva PT realizada en este tiempo puede

dar lugar a una falsa conversión. En un paciente no infectado, la práctica repetida de la PT no induce sensibilidad tuberculínica (Mendizies, 1999).

Actitud a adoptar ante una prueba de la tuberculina negativa:

1. Sin antecedentes de vacunación con BCG:
 - a) En menores de 55-65 años se aceptará el resultado como negativo y al sujeto como no infectado.
 - b) En mayores de 55/65 años se repetirá la PT 7-10 días después de la primera y ese resultado será el que se acepte.
2. Con antecedentes de vacunación con BCG:
 - a) Sin tener en cuenta la edad se repetirá 7-10 días después la PT aceptando el resultado de esta segunda prueba.

El test cutáneo de la tuberculina (Huebner *et al*, 1993) y la producción de interferón gamma (IFN- γ) en presencia de un antígeno específico, se han usado para detectar infección por *Mycobacterium tuberculosis* (Pai *et al*, 2004).

4.2.2 Técnicas *in vitro* de interferón-gamma (IFN- γ)

En los últimos años se han desarrollado nuevas pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la infección tuberculosa. Las técnicas se basan en la detección del (IFN- γ) liberado como respuesta a la estimulación *in vitro* de las células T sensibilizadas presentes en sangre periférica con antígenos específicos de *M. tuberculosis* (Lalvani *et al*, 2001). Esta técnicas se denominan genéricamente IGRAs (IFN- γ Release Assays). Actualmente se emplean para la estimulación de las células T los antígenos codificados en la región de delección RD1, como los denominados *early secretory antigen target-6* (ESAT-6), *culture filtrate proteína- 10* (CFP-10) y el antígeno TB7.7 (Andersen *et al*, 2000). Estos antígenos están presentes en el complejo *M. tuberculosis* pero ausentes tanto en la vacuna antituberculosa como en otras micobacterias ambientales (excepto en *M. kansasii*, *M. marinum* y *M. szulgai*). Por lo tanto, estas técnicas discriminan mejor a los individuos infectados por *M. tuberculosis* de los que han recibido la vacuna antituberculosa y de los expuestos a otras micobacterias (Domínguez *et al*, 2006; Domínguez *et al*, 2008). Los estudios realizados muestran las ventajas de este nuevo test (Arend *et al*, 2000; Brock *et al*, 2001; Lalvani *et al*, 2001). Estas pruebas incorporan además controles para detectar la anergia y excluir así los falsos negativos. Por otra parte, pueden repetirse inmediatamente, sin que se vean afectadas por el efecto de refuerzo mencionado para la PT.

Esta tecnología *in vitro* presenta algunas ventajas adicionales respecto a la PT (Menzies *et al*, 2007): se evita la subjetividad en la interpretación de los resultados; la determinación puede repetirse si es necesario; la obtención de los resultados es rápida; se elimina la visita de lectura; se evita la pérdida de

individuos que no acuden a la lectura; es de fácil estandarización y aplicación en el laboratorio; permite la inclusión de controles positivos para identificar a los pacientes anérgicos, y al realizarse en el laboratorio, no en un lugar visible como la PT, se respeta la privacidad del paciente. El inconveniente de la técnica es su mayor coste económico.

Se necesitan más estudios para determinar su eficiencia, pero se acepta que en países con elevada prevalencia de TB su empleo es la opción con mejor coste-beneficio.

4.2.2.1 Determinación de Interferón-gamma

Se parte del principio de que los linfocitos T de individuos sensibilizados producen IFN- γ cuando entran en contacto con antígenos de *M. tuberculosis* (Tufariello *et al*, 2003).

Existen estudios con IFN- γ ya comercializados: ELISPOT (Oxford Immunotec, Oxford, United Kingdom) QuantiFERON-TB, su versión mejorada QuantiFERON-TB Gold assay (Cellestis International, Carnegie, Australia).

a) ELISPOT

El ensayo con ELISPOT para el diagnóstico de la infección de *M. tuberculosis* se basa en la detección de linfocitos T específicos frente a antígenos de *M. tuberculosis*. El IFN- γ liberado *ex vivo* desde estas células puede ser detectado por el ELISPOT (Lalvani *et al*, 1998). Que es un método extremadamente sensible. Cada grupo de linfocitos T da lugar a una mancha oscura en la muestra y la lectura del número de manchas da el resultado. Los linfocitos T detectados por ELISPOT son células que han estado recientemente en contacto con el antígeno *in vivo* y pueden liberar rápidamente IFN- γ cuando son re-expuestas al antígeno (Kaeck *et al*, 2002). En contraste, los linfocitos T de memoria, que persisten tras el aclaramiento del patógeno, son relativamente quiescentes y es menos probable que liberen IFN- γ durante la prueba ELISPOT *ex vivo* (Lalvani *et al*, 1998).

Lalvani y colaboradores desarrollaron la primera generación de los test ELISPOT para TB latente usando el péptido ESAT-6 para estimular muestras de sangre.

Determinados estudios han demostrado que los resultados del ELISPOT son mejores para la identificación de individuos con infección latente que el test cutáneo.

b) Test del Quantiferón-TB

La técnica del Quantiferón-TB® mide la liberación de interferón-gamma en la sangre en respuesta a la estimulación por PPD. El IFN- γ secretado por los linfocitos T en el plasma es medido por ELISA e indica la posibilidad de la infección por *M. tuberculosis*. Diferentes estudios han demostrado que la prueba del Quantiferón-TB era igual de efectiva que el test cutáneo y que

estaba menos influenciada por la vacunación previa con BCG, así como menos influenciada por infecciones de micobacterias no tuberculosas, eliminando también la variabilidad debida al factor humano que valora el test cutáneo. (Pottumarthy *et al*, 1999).

4.2.3 Valoración clínica

4.2.3.1. Tuberculosis Pulmonar

Las manifestaciones clínicas de la TB no permiten diferenciarla con precisión de otras enfermedades respiratorias. El comienzo es insidioso y poco alarmante, por lo que pueden pasar varios meses hasta que se llegue al diagnóstico de certeza (Korzeniewska-Kosella *et al*, 1994). De ahí la importancia de que el médico ponga en marcha las exploraciones complementarias ante la más mínima sospecha, a veces incluso en sujetos asintomáticos (contactos, inmunodeprimidos, etc.). La primoinfección suele ser subclínica o dar síntomas inespecíficos (tos, febrícula, etc.).

Si persisten síntomas respiratorios en el niño durante más de 10 ó 15 días es aconsejable realizar una radiografía de tórax, en especial si se acompañan de manifestaciones sistémicas o extrapulmonares (anorexia, pérdida de peso, eritema nudoso).

La TB del adulto tiene también con frecuencia un comienzo solapado en forma de tos, expectoración mucopurulenta, sudoración nocturna, astenia, etc., aunque en algunas ocasiones el inicio es agudo, con fiebre alta, escalofríos, expectoración hemoptoica o hemoptisis franca. En estos casos, el diagnóstico suele realizarse antes, pero no existe una correlación entre la extensión y gravedad de las lesiones y la magnitud o aparatosidad de los síntomas.

La TB miliar plantea a veces el problema de diagnóstico diferencial con la fiebre de origen desconocido, pues en el período inicial hay casos en los que no es visible el patrón radiográfico de afectación intersticial. Las diseminaciones pulmonares extensas cursan con disnea progresiva e insuficiencia respiratoria que puede desembocar, en los casos graves, en distrés respiratorio del adulto.

En la TB de los enfermos portadores de anticuerpos frente al VIH, sin inmunodeficiencia desarrollada, los síntomas suelen ser similares a los observados en los demás pacientes, pero en el enfermo con SIDA, el cuadro clínico inicial acostumbra a ser inespecífico, con predominio de síntomas generales (fiebre nocturna, astenia, pérdida de peso, adenopatías periféricas, etc.). En un elevado porcentaje de casos, la reacción a la tuberculina es negativa (en los sujetos VIH positivos sin SIDA, el porcentaje oscila del 30 al 50% de los casos). Otra característica diferencial es la rápida diseminación de la enfermedad y la elevada tasa de localizaciones extrapulmonares, que llega en algunas series hasta el 60%.

La exploración física no es de gran ayuda en el diagnóstico etiológico, ya que muchas veces es en apariencia normal. No obstante, debe realizarse siempre de manera sistemática y buscar algunos signos orientativos.

En ocasiones es posible auscultar crepitantes en el espacio infraclavicular o en la zona interescapulovertebral, en relación con lesiones exudativas y cavitaciones. En las diseminaciones broncógenas se oyen roncus, uni o bilaterales.

Cuando hay afectación pleural, la semiología es la típica del derrame: matidez a la percusión, ausencia de vibraciones vocales, disminución o abolición del murmullo vesicular, soplo pleural, etc.

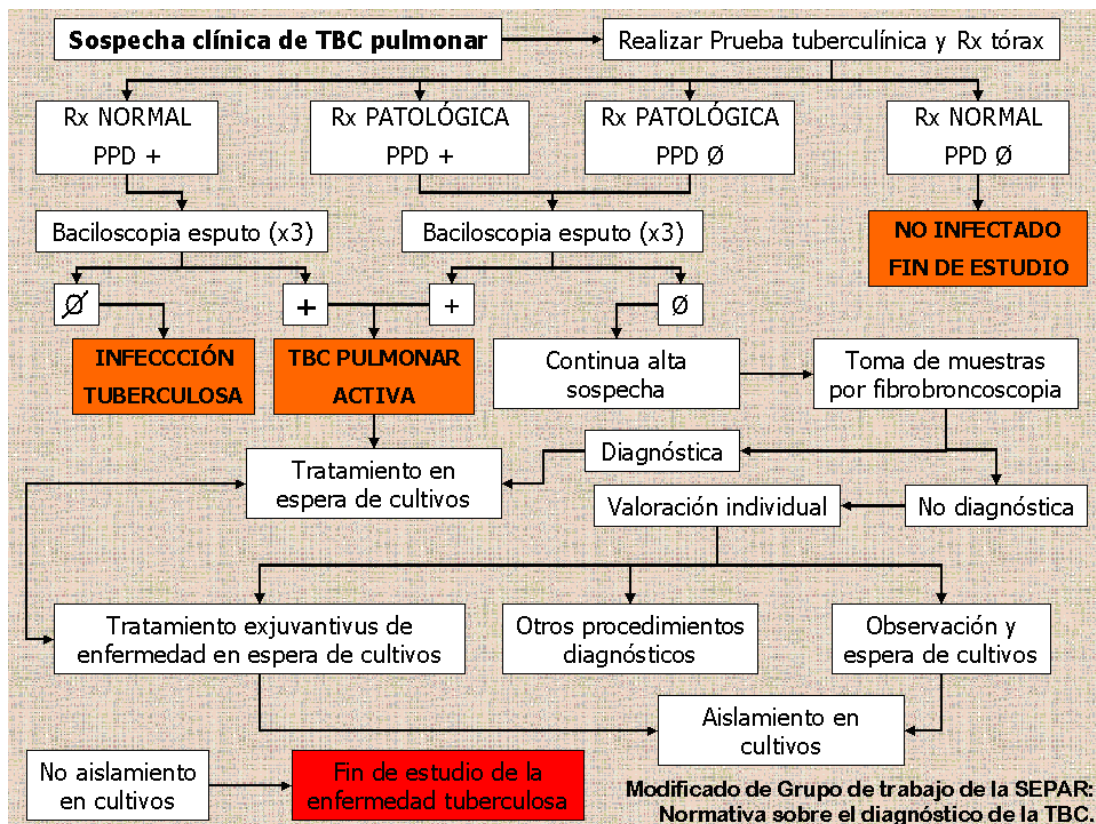


Figura 18: Patrones de decisión ante una sospecha clínica de tuberculosis pulmonar

4.2.3.2. Tuberculosis extrapulmonar

En localizaciones extratorácicas, pueden hallarse otros signos como eritema nudoso, adenopatías, fístulas cervicales y submaxilares, fístulas de ano, afectación osteoarticular, etc.

Cuando el enfermo presenta disfonía, conviene practicar laringoscopia indirecta y, si se sospecha diseminación hematógena, exploración del sistema nervioso (en particular los signos meníngeos) y examen del fondo de ojo. La hematuria sin dolor cólico y la piuria con orina "estéril" hacen aconsejable investigar una posible TB renal.

El estudio analítico habitual tampoco ofrece datos característicos. Es frecuente observar una moderada anemia e hipoproteïnemia, sobre todo si la evolución es prolongada, como en cualquier otra enfermedad consuntiva. La velocidad de sedimentación suele estar acelerada pero, en general, no excede los 50-60 mm a la primera hora. En las formas agudas y febriles puede haber leucocitosis más o menos intensas con neutrofilia, aunque es más frecuente la linfocitosis, en especial en las formas subagudas y crónicas.

En bastantes casos se observa al inicio (antes de empezar el tratamiento) un discreto trastorno de la función hepática (elevación de transaminasas y/o GGT), que la mayoría de las veces no se debe a infiltración del hígado, sino al síndrome tóxico o a la frecuente asociación de la TB con el alcoholismo. Algunos casos de TB diseminadas graves pueden cursar con hiponatremia e hipocloremia por síndrome de secreción inadecuada de hormona antidiurética (Recomendaciones SEPAR, 2002).

4.2.3.3. Análisis de líquidos corporales

La Adenosina deaminasa, también conocida como ADA, es una enzima implicada en el metabolismo de las purinas. Su presencia es necesaria para metabolizar la adenosina de la comida y el reciclaje de los ácidos nucleicos en los tejidos. Muchos artículos y revisiones han hablado sobre la utilidad de la determinación de la ADA en los fluidos corporales (espinal, pleural, ascítico, pericardial) para el diagnóstico de la meningitis tuberculosa (Kashyap *et al*, 2006; López-Cortes *et al*, 1995), pleuritis tuberculosa (Banales *et al*, 1991; Goto *et al*, 2003; Pérez-Rodríguez *et al*, 2000), TB peritoneal (Aston *et al*, 1997; Gilroy *et al*, 2006) y pericardial (Tuon *et al*, 2006; Reuter *et al* 2006).

La determinación de ADA es fácil y barata. La especificidad es muy alta en fluidos con una tasa linfocito/neutrófilo mayor de 0.75 (Burgess *et al*, 1996; Diacon *et al*, 2003). La ADA se determina colorimétricamente.

Otra prueba que se ha mostrado útil en el estudio de la TB pleural ha sido la determinación de lisozima en el líquido pleural, y sobre todo, el cociente de éste con el valor de la lisozima en suero. Así, un cociente superior a 1,2 posee también una excelente sensibilidad y especificidad, con algunos falsos positivos en el caso de empiemas y artritis reumatoide.

La proporción y el número absoluto de los linfocitos T están notablemente aumentados con respecto a los que existen en sangre y las linfoquinas que éstos son capaces de producir también están incrementadas. Una de estas linfoquinas, el interferón, se ha mostrado también como un parámetro útil en el diagnóstico de la TB pleural.

También se ha demostrado que algunos marcadores tumorales como el IAP (*immunosuppressive acidic protein*) y el AGP (*alpha1-acid glycoprotein*) han dado concentraciones significativamente superiores en el líquido pleural tuberculoso que en los derrames neoplásicos.

4.2.4 Técnicas de imagen

La TB, tanto la pulmonar como la extrapulmonar, no presenta ningún signo radiológico patognomónico. Así, aunque existan lesiones radiológicas altamente sugestivas de TB (cavitaciones de lóbulos superiores) y se acompañen de una situación epidemiológica favorable, nunca se debe admitir el diagnóstico de esta enfermedad con un simple estudio radiológico, y éste sólo indicará que se deben realizar estudios microbiológicos (Geng *et al*, 2005).



Figura 19: Radiografía de Tórax

Tampoco el pronóstico y la respuesta al tratamiento se pueden valorar decisivamente por la evolución radiológica, puesto que la regresión de las lesiones puede producirse en un período de entre 3 y 9 meses, y puede haber un incremento paradójico de las lesiones en el primer mes del tratamiento, sin que ello suponga un fracaso de la medicación. Por ello, a todo paciente con TB sólo estará indicado realizarle dos estudios radiográficos, uno de ellos al inicio y el otro al finalizar la terapéutica. No deben solicitarse radiografías en cada una de las revisiones.

A pesar de lo indicado, hay que reconocer que en la TB pulmonar la principal sospecha diagnóstica se fundamenta en una radiología sugestiva. Al ser una técnica que en esta localización, tiene pocos falsos negativos, se considera una técnica sensible aunque inespecífica.

La tuberculosis primaria, cuando se manifiesta radiográficamente, suele ser como infiltrado alveolar, con o sin adenopatías hiliares o mediastínicas, o bien como afectación ganglionar sin lesión parenquimatosa. Además, también se pueden encontrar radiografía de tórax normal (en algunas formas de TB primaria, y a menudo en infectados por el VIH severamente inmunodeprimidos), consolidación pulmonar, adenopatías (generalmente unilaterales), cavitación (rara y de forma aislada), derrame pleural (más frecuente en jóvenes y adolescentes) e, incluso, atelectasia de determinados lóbulos por compresión de adenopatías mediastínicas (más frecuente en niños y adolescentes).

En el caso de la tuberculosis post-primaria o de reactivación, la afectación parenquimatosa pulmonar es un hallazgo constante y se localiza, con mayor frecuencia, en los segmentos apical y posterior de los lóbulos superiores o en el apical del inferior. También pueden encontrarse tuberculomas (nódulos de diferente tamaño) con variaciones en su morfología y de localización preferente en los lóbulos superiores. La cavitación es frecuente (45- 60%) así

como la diseminación broncógena a otras áreas del pulmón. El derrame pleural también es frecuente.

A veces, la radiografía puede presentar una consolidación parenquimatosa indistinguible de una neumonía de otra etiología, lo que puede conllevar un retraso diagnóstico, sobre todo si la presentación clínica es aguda y no insidiosa. A veces es necesario realizar radiografía de tórax en hiperlordosis para visualizar mejor pequeñas lesiones en ambos vértices pulmonares.

La tuberculosis miliar puede ser una manifestación tanto de enfermedad primaria como post-primaria. El patrón radiográfico típico serían múltiples nódulos finos, de tamaño inferior a 3 mm, generalmente más profusos en lóbulos inferiores y para cuya visualización es de gran utilidad la identificación del espacio retrocardíaco en la radiografía lateral. Estos nódulos finos pueden persistir en el tiempo, incluso después de haber curado la enfermedad.

En la radiología de la TB en los infectados por el VIH, las distintas imágenes van a depender del grado de inmunodepresión que padezca el enfermo. Si ésta no es severa y el enfermo había sido infectado en el pasado, lo más normal es que ocurra una reactivación endógena de estos bacilos y se producirán las lesiones típicas de la TB post-primaria.

Si la inmunodepresión es severa, cualquier exposición a una fuente de contagio o a una reactivación endógena, no encontrará oposición por parte de las defensas del organismo y se producirán, predominantemente, las lesiones típicas de la TB primaria, con frecuente afección linfática y diseminaciones hematógenas. En este último caso son frecuentes las radiografías de tórax normales y la participación extrapulmonar.

Para una valoración más correcta del mediastino es de gran utilidad la tomografía computarizada que, además, será útil para localizar los territorios afectados accesibles a punción diagnóstica en los casos dudosos. Salvo en casos muy excepcionales, no está indicado realizar tomografía computerizada en el diagnóstico de la TB.

5.- DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Un tercio de la población mundial -unos dos billones de personas- se cree que tienen una infección latente por *M. tuberculosis*. Los individuos con infección latente tienen un 10% de riesgo a lo largo de su vida de desarrollar la enfermedad, y esto es un enorme reservorio global. Es imposible cultivar *M. tuberculosis* en gente sana con infección latente, por ello es vital tener herramientas eficientes para diagnosticar TB activa e infección latente de *M. tuberculosis*.

La TB activa se diagnostica detectando bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* complex en muestras del tracto respiratorio (TB pulmonar) o de otras localizaciones (TB extrapulmonar). Aunque se han desarrollado nuevos métodos de diagnóstico molecular, la tinción de bacilos ácido alcohol resistentes y el cultivo en medio de Löwenstein-Jensen son aún los métodos habituales para el diagnóstico de TB activa, sobre todo en los países en vías de desarrollo (Caminero Luna, 2003; Palomino *et al*, 2007).

La detección de bacilos ácido alcohol resistente es un método rápido y barato, es muy útil para identificar a pacientes altamente contagiosos.

El cultivo se usa para detectar casos con carga bacteriana baja, para comprobar la susceptibilidad a los fármacos de las cepas o en aquellos casos donde se sospecha infección por algún otro miembro del género *Mycobacterium*.

Estos dos métodos se pueden usar también para monitorizar la efectividad del tratamiento y ayudar a determinar cuándo un paciente es menos probable que sea infeccioso.

Unos dos tercios de los cultivos positivos permanecen probablemente indetectados en todo el mundo, los esfuerzos para controlar la enfermedad se han centrado más en curar los casos de TB diagnosticados que en detectarlos (Gupta *et al*, 2004, Dye *et al*, 2003).

5.1. TOMA DE MUESTRAS

El éxito para aislar el patógeno requiere que las mejores muestras sean recogidas de manera adecuada, transportadas con rapidez y procesadas cuidadosamente.

1. Las muestras deben recogerse siempre que sea posible, antes de iniciar el tratamiento.
2. El enfermo ha de ser instruido sobre la forma más adecuada de recoger el esputo y sobre la importancia de que el material no sea saliva ni secreciones rinofaríngeas. Si tiene dificultad para expectorar, se puede intentar obtener esputo inducido mediante *clapping* y/o aerosol con suelo fisiológico.
3. Se informará al paciente supuestamente bacilífero sobre la conveniencia de recoger las muestras en espacios abiertos o en habitaciones bien ventiladas, lo más alejado posible de otras personas.

4. Los esputos y la orina deben enviarse en frascos limpios de vidrio o plástico de boca ancha y tapón a rosca hermético.
5. Es aconsejable realizar un estudio seriado para obtener mayor rentabilidad, como mínimo tres esputos u orinas obtenidos en días sucesivos. Aunque varios estudios han mostrado que el valor del tercer esputo es prescindible para el diagnóstico de TB, ya que prácticamente todos los casos son identificados en la primera o segunda muestra (Yassin *et al*, 2003; Nelson *et al*, 1998; Dorronsoro *et al*, 2000; Finch *et al*, 1997).
6. Una vez recogida la muestra, la enfermera identificará el envase con los datos personales del paciente antes de su envío al laboratorio.
7. Las muestras se remitirán inmediatamente después de su obtención al laboratorio. Si por alguna causa el traslado se demora, han de guardarse en el frigorífico.
8. Cuando la muestra se obtiene mediante manipulación directa (punción de abscesos, LCR, biopsias, etc.), es preciso observar la más rigurosa asepsia en la técnica y colocar el material en un envase estéril.
9. Siempre que se practique una biopsia de cualquier órgano por sospecha de TB, deberá remitirse un fragmento al laboratorio de microbiología y otro al de anatomía patológica. La muestra destinada a estudios microbiológicos debe enviarse sin fijar, con unas gotas de agua destilada para evitar su desecación y con arreglo a las normas señaladas en los puntos 7 y 8.
10. Cuando el enfermo no expectora, la fibrobroncoscopia es la técnica de elección, ya que permite realizar aspirados bronquiales selectivos, lavado broncoalveolar y biopsia de las lesiones bronquiales, siendo su rentabilidad superior a la del aspirado gástrico en ayunas. Estas muestras deben remitirse y ser procesadas en el laboratorio inmediatamente. El anestésico local presente en las mismas, generalmente lidocaína, tiene un efecto inhibitor sobre las micobacterias en pocas horas y puede ser causa de cultivos falsamente negativos si se difiere su procesamiento (Sarkar *et al*, 1980; de Gracia *et al*, 1988).
11. Si se trata de pacientes VIH positivos con sospecha de tuberculosis pueden remitirse al laboratorio diferentes muestras (heces, esputos, aspirados bronquiales, lavados broncoalveolares, ganglios linfáticos, biopsias de tejidos, LCR, muestras de orina, etc.). En caso de síndrome febril persistente y sospecha de infección diseminada por micobacterias, deben realizarse hemocultivos.

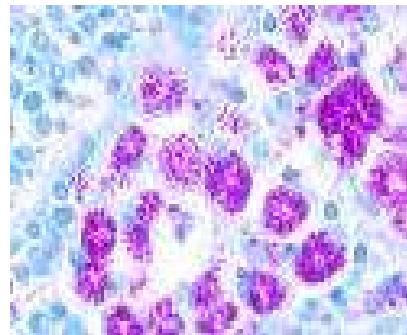
5.2. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CLÁSICOS

El diagnóstico microbiológico clásico de la tuberculosis se basa en tres etapas sucesivas (Caminero Luna, 2003; Palomino *et al*, 2007):

1. Demostración de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en preparaciones teñidas mediante la técnica de Ziehl-Neelsen o la variante de tinción con fluorocromos.
2. Aislamiento de *M. tuberculosis* en cultivo puro y la posterior identificación.
3. En determinados casos se completa con el estudio de sensibilidad *in vitro* a los fármacos antituberculosos (antibiograma).

5.2.1. Tinción y examen microscópico.

El hallazgo de bacilos ácido-alcohol resistentes en extensiones teñidas y examinadas al microscopio es la primera evidencia de la presencia de micobacterias en una muestra clínica. Es el procedimiento más fácil y rápido que se puede efectuar, y aporta al clínico una confirmación preliminar del diagnóstico.



Desempeña un papel importante en el diagnóstico temprano de la infección por micobacterias ya que debido a su lento crecimiento, el cultivo resulta eficaz solamente tras semanas de incubación. En países en vías de desarrollo la tinción puede ser el único método disponible.

Figura 20: Muestra teñida

La tinción de la muestra se basa en el alto contenido de lípidos en la pared celular de las micobacterias que las hace resistentes a la decoloración por una solución Ácido-Alcohol tras la primera tinción.

La técnica clásica de Ziehl-Neelsen o sus variantes y la tinción con fluorocromos (auramina) son igualmente eficaces y se basan en el mismo principio. La ventaja de la fluorescencia es su mayor rapidez y sensibilidad (en ella la observación se realiza sin inmersión y con un campo de observación más amplio con lo que se gana tiempo).

Detalles de cómo se debe llevar a cabo se recogen en la página de internet de los laboratorios de WHO: <http://www.phppo.cdc.gov/dls/ila/documents/lstc2.pdf>.

Para la correcta interpretación de los resultados de un examen microscópico directo deben tenerse en cuenta que:

1. La ácido-alcohol resistencia es una propiedad común a todas las especies del género *Mycobacterium* y no sólo de *M. tuberculosis*.

2. La ausencia de BAAR en una muestra clínica no descarta el diagnóstico de TB, ya que es una técnica de sensibilidad limitada.
3. Cuando los pacientes bacilíferos son tratados con regímenes de primera elección suelen negativizar sus esputos a partir de las 2-3 semanas de tratamiento.
4. Al informar los resultados del examen microscópico, el microbiólogo debe proporcionar al clínico una estimación aproximada del número de BAAR detectados. La reducción del número de bacilos emitidos por el enfermo orienta sobre la eficacia del tratamiento siempre que se acompañe de una mejoría de sus síntomas clínicos.

Recientemente, se ha descrito un método de detección de los bacilos tuberculosos que no requiere tinción. Dicho método se basa en la capacidad natural de las micobacterias, incluida *M. tuberculosis*, de emitir autofluorescencia en el rango azul del espectro (Patiño *et al*, 2008). La puesta a punto de esta metodología podrá facilitar y abaratar el diagnóstico al utilizar detección fluorescente, más rápida y sensible como se ha mencionado, sin el requerimiento de usar fluorocromos caros que presentan inestabilidad química, lo que condiciona con un periodo limitado de uso.

5.2.2 Cultivo de las micobacterias.



Figura 21: Colonias en medio sólido

Todas las muestras clínicas sospechosas de contener micobacterias se deben sembrar en medios de cultivo adecuados por las siguientes razones:

1. Los cultivos son mucho más sensibles que los exámenes microscópicos; pueden detectar una cantidad tan pequeña como 10 bacterias por mL de muestra clínica digerida y concentrada.
2. El aislamiento en cultivo puro es necesario para poder identificar la especie de las cepas aisladas. Si la baciloscopia es un índice de la eficacia del tratamiento, el cultivo permite asegurar la negativización y curación del paciente.
3. La observación de BAAR es fácil y rápida pero no permite confirmar el diagnóstico de TB porque otras micobacterias no tuberculosas son también Ácido-Alcohol resistentes. Por otra parte se requiere una mayor carga bacteriana para que se puedan ver BAAR. Mediante el cultivo se estima que se detectan 10-1.000 micobacterias viables por cada mL de muestra.

Desde el punto de vista del cultivo hay dos tipos de muestras, las recogidas de forma estéril o cuyo origen sea localizaciones normalmente

estériles y las que se consideran contaminadas. Las primeras, pueden ser inoculadas directamente en el medio de cultivo. Las muestras contaminadas requieren ser procesadas antes de ser cultivadas para eliminar la microbiota asociada, si no es eliminada apropiadamente, esta microbiota crecerá en el medio de cultivo antes que la micobacteria pueda desarrollar colonias (Caminero Luna, 2003; Palomino *et al*, 2007).

Existen diferentes métodos para minimizar la contaminación de los cultivos, la mayoría de los cuales incluye la digestión del mucus y un tratamiento para eliminar los microorganismos que constituyen la microbiota habitual. Ambos procedimientos deben hacerse para maximizar la probabilidad de aislar micobacterias en el cultivo. No es posible aplicar un único método de descontaminación en todas las circunstancias. Se debe usar el que permita, en un laboratorio determinado, mantener la tasa de contaminación entre el 3% y el 5%. Una tasa de contaminación menor del 3% puede indicar que los métodos usados son demasiado fuertes y pueden estar destruyendo micobacterias (Della Latta *et al*, 1998). Los métodos más usados utilizan: hidróxido de sodio, hidróxido de N-acetilcisteína-sodio, hidróxido de sodio más cloruro sódico y ácido oxálico.

Tras la descontaminación se procede a la concentración de las micobacterias que se realiza normalmente mediante centrifugación

Existen diferentes tipos de medios sólidos adecuados para el aislamiento de micobacterias a partir de muestras clínicas. Los más utilizados son los que tienen como base el huevo (Löwenstein-Jensen, Colestos, etc.) y los semisintéticos con agar (7H10 y 7H11 de Middlebrook). Detalles de la composición y preparación de los medios de cultivo previamente mencionados pueden encontrarse en internet (<http://www.phppo.cdc.gov/dls/ila/documents/lstc3.pdf>).

La incubación de los medios sembrados en una atmósfera enriquecida con un 5- 10% de CO₂ favorece el crecimiento de *M. tuberculosis*. Cualquiera que sea el medio de cultivo utilizado, el tiempo transcurrido entre la recepción de la muestra y la emisión del resultado suele ser de entre 3 a 6 semanas.

El número de colonias obtenidas por cultivo se debe cuantificar en el momento de emitir el informe al clínico.

Los medios de cultivo convencionales (aquellos basados en huevo y agar) deben ser examinados dos veces por semana las primeras cuatro semanas, comenzando el día 3-5 post-inoculación, y una vez por semana hasta la octava semana. Todos aquellos cultivos con crecimiento, deben estudiarse al microscopio por tinción AAR y, caso de ser positiva, ser consideradas cultivo positivo para micobacterias pendiente de identificación.

Todos los cultivos positivos para micobacterias deberían ser identificados hasta el nivel de especie, usando procedimientos bioquímicos o moleculares.

La contaminación cruzada puede dar lugar a falsos positivos. Las causas de falsos positivos son la contaminación de los aparatos de recogida de muestras como por ejemplo los broncoscopios, errores humanos o contaminación cruzada entre muestras del laboratorio. Los pacientes que sólo tengan un cultivo positivo cuando se han inoculado dos tubos y aquellos pacientes con pocas colonias en el cultivo deben repetirse o ser examinados más a fondo para descartar la posibilidad de un resultado falso positivo (Burman *et al*, 2000).

5.2.2.1. Métodos de cultivo rápido.

La búsqueda de técnicas más rápidas y sensibles de cultivo ha permitido introducir en los laboratorios clínicos otros métodos de cultivo de las muestras:

Aunque conocidos durante décadas, los medios de cultivo líquidos para micobacterias nunca habían llamado la atención de los microbiólogos. De hecho la habilidad de un medio líquido de hacer crecer las micobacterias más deprisa no se había tenido en cuenta por su susceptibilidad a la contaminación. El uso de combinaciones de antimicrobianos que inhibían el crecimiento de los posibles contaminantes (bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos) permitió que se comenzaran a considerar útiles.

Los medios de cultivo líquido son significativamente más sensible que los medios sólidos con base de huevo en el aislamiento de micobacterias a partir de muestras clínicas. Sin embargo, una de sus desventajas es su elevado costo, que habitualmente es excesivo en los países con recursos limitados (Pottumarthy *et al*, 1999).

Actualmente el crecimiento en medio líquido se usa también para una detección más rápida de la determinación de resistencia/sensibilidad a los antimicobacterianos.

Algunos ejemplos se explican a continuación:

• BACTEC TB-460



Figura 22: Inoculación de un vial de BACTEC

El sistema BACTEC TB-460 (Becton Dickinson, Sparks, MD) fue el primero, y durante muchos años el único sistema automático usado en el diagnóstico de micobacterias. Usa instrumentos radiométricos y un medio modificado de Middlebrook 7H9 en el que uno de los componentes, el ácido palmítico está radiomarcado con ^{14}C . Al vial marcado se le añade aire que contiene 5% de CO_2 .

Posteriormente, se analiza el gas aspirado para cuantificar la presencia de $^{14}\text{CO}_2$. Cuando hay micobacterias viables en el cultivo el ácido palmítico marcado se

metaboliza y libera CO_2 en la fase gaseosa.

Detectan automáticamente el crecimiento micobacteriano midiendo la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ producido por la metabolización del sustrato. En relación a los sistemas tradicionales de cultivo el sistema BACTEC® tiene las siguientes ventajas:

1. Ahorro de tiempo en la detección del crecimiento.
2. Mayor sensibilidad, tanto para el aislamiento de *M. tuberculosis* como de otras micobacterias.
3. Posibilidad de identificar *M. tuberculosis* en 4-5 días y de realizar antibiogramas a los fármacos de primera elección (incluyendo la pirazinamida) en tiempos medios de 3-6 días, en lugar de los 21-42 días que exigen los métodos convencionales.

El principal inconveniente del sistema BACTEC® reside en tener que trabajar con ^{14}C , lo que requiere disponer de los permisos necesarios para la manipulación y almacenamiento de radioisótopos.

• BACTEC MGIT960

Para tratar de eliminar el uso de ^{14}C se han buscado técnicas que permitan detectar el crecimiento micobacteriano mediante fluorimetría. Los medios que se están probando llevan incorporado un compuesto de rutenio que emite fluorescencia detectable a medida que disminuye la tensión parcial de O_2 del medio como consecuencia del metabolismo microbiano. Esta medición del crecimiento por fluorimetría está sustituyendo a los métodos radiométricos.

El sistema BACTEC MGIT960 (Becton Dickinson, Sparks MD) usa la tecnología indicada. El medio *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (MGIT) se obtiene a partir de un medio Middlebrook al que se añade una mezcla de ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa. Se estimula el fondo de cada tubo con luz ultravioleta viéndose la presencia de fluorescencia. Los tubos que emiten fluorescencia son considerados positivos. Las medidas se realizan manualmente.

Este procedimiento es similar a otros sistemas semi-automáticos respecto a sensibilidad y rapidez (Alcaide *et al*, 2000; Badak *et al*, 1996; Scarparo *et al*, 2002; Tortoli *et al*, 1999; Casal *et al*, 1997; Pfyffer *et al*, 1997; Tortoli *et al*, 1997).

• VersaTREK

El sistema VersaTREK (previamente conocido como el sistema ESP II) usa un medio Middlebrook 7H9 modificado al que se le añade mezcla de ácido



Figura 23: Viales de BACTEC MGIT960

oleico, albúmina, dextrosa y catalasa. Pueden usarse dos mezclas diferentes de antimicrobianos según sean muestras estériles o contaminadas. Las botellas tienen una esponja de celulosa cuya gran superficie potencia el crecimiento de las micobacterias. Las botellas son inoculadas a través de una pared de goma por medio de una jeringuilla. Si hay micobacterias presentes se consume oxígeno debido al metabolismo bacteriano y se reduce la presión interna. El lector automático está monitorizando continuamente las botellas y alertan cuando son positivas o al final del periodo de incubación.

Numerosos estudios han evaluado este sistema en comparación con otros medios sólidos u otros sistemas semi-automáticos. VersaTREK parece ser mejor que los sistemas sólidos pero no muestra un mejor resultado frente a otros sistemas semi-automáticos (Tortoli *et al*, 1998; Williams-Bouyer *et al*, 2000; Woods *et al*, 1997).

• BacT/Alert 3D

El BacT/Alert 3D (anteriormente conocido como MB/BacT) usa un medio Middlebrook 7H9 modificado con un suplemento de mezcla de ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa. También se le añade una mezcla de antibióticos. Las botellas tienen un sensor de CO₂ en el fondo y son inoculadas a través de una tapa de goma por medio de una jeringa. El sensor recibe una luz que refleja un rayo que es monitorizado por un fotodiodo. Las botellas que producen cambios específicos en la intensidad de la luz reflejada son consideradas positivas. Si hay micobacterias viables el CO₂ producido por el metabolismo produce un cambio en el color del sensor, de verde a amarillo que altera la intensidad del rayo reflejado. También de forma automática, el lector avisa cuando se convierte en positivo y al final del periodo de incubación. Realiza mediciones a intervalos de 10 minutos.

Al igual que los sistemas previos, en estudios realizados comparando este sistema con los medios convencionales, ha resultado claramente mejor y más rápido pero no se han observado diferencias significativas con otros sistemas semi-automáticos (Alcaide *et al*, 2000; Brunello *et al*, 1999; Laverdiere *et al*, 2000; Nogales *et al*, 1999; Piersimoni *et al*, 2001; Rohner *et al*, 1997)

5.2.3. Técnicas bioquímicas para la identificación de las micobacterias.

La identificación final de *M. tuberculosis* se basa clásicamente en características como su lento crecimiento, la morfología de la colonia así como en test bioquímicos. Desde un punto de vista práctico, la mayoría de los cultivos de muestras clínicas humanas pertenecen a la especie *M. tuberculosis*, aunque dependiendo del área geográfica y las circunstancias epidemiológicas puede ser necesario diferenciar entre varias especies del género.

Las características de cultivo principales de *M. tuberculosis* son: bacilos de crecimiento lento; colonias no pigmentadas; niacina positivas; se inhiben por ácido nitrobenzoico y tienen actividad nitrato reductasa.

Las principales técnicas bioquímicas que permiten identificar al *M. tuberculosis* son:

- **Test de acumulación de Niacina**

El ácido nicotínico o niacina se produce por todas las micobacterias, pero algunas especies como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium simiae* y *Mycobacterium bovis* BCG, la excretan. La excreción de niacina se acumula en el medio de cultivo y se evidencia en presencia de cloruro de cianógeno.

- **Crecimiento en presencia de ácido p-nitrobenzoico.**

Este compuesto inhibe el crecimiento de muchas especies del *M. tuberculosis* complex: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* and *M. microti* (Tsukamura *et al*, 1984; Leão *et al*, 2004).

- **Test de reducción del Nitratos.**

Este test es especialmente útil para diferenciar *M. tuberculosis*, que produce una reacción positiva frente a *M. bovis*, que la da negativa (Tsukamura *et al*, 1984; Vincent *et al*, 2003).

- **Test de la Catalasa.**

La catalasa es una enzima intracelular que transforma el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. El test de actividad Catalasa a 68° C es un test que mide la tolerancia al calor del enzima en altas temperaturas. Característicamente *M. tuberculosis* da resultados negativos mientras que otras especies del complejo *M. tuberculosis* los dan positivos (Vincent *et al*, 2003).

- **Test de la Pirazinamidasas.**

La pirazinamidasas es un enzima que hidroliza pirazinamida y obtiene amonio y ácido pirazinoico. Este test es útil para diferenciar *M. tuberculosis* (resultado positivo) de otras especies del complejo (resultado negativo), con la excepción de *M. canettii* que también da un resultado positivo. Algunas cepas de *M. tuberculosis* pueden adquirir resistencia a pirazinamida debido a selección inducida por el tratamiento con este antimicrobiano (Vincent *et al*, 2003).

- **Crecimiento en presencia de ácido hidrazina thiophen-2-carboxílico.**

Este test permite distinguir *M. tuberculosis*, que crece en presencia de este compuesto, frente a otros miembros del complejo *M. canettii* y la mayoría de micobacterias no tuberculosas dan también resultados positivos con este test (Vincent *et al*, 2003; Leão *et al*, 2004).

5.2.4. Diagnóstico serológico

En la búsqueda de métodos diagnósticos rápidos y baratos de la infección por *M. tuberculosis*, el inmunodiagnóstico es considerado una opción atractiva.

Básicamente usa las respuestas específicas de la inmunidad humoral y celular del huésped para inferir la presencia de infección o de enfermedad.

Se han desarrollado una gran variedad de test serológicos que detectan anticuerpos para determinar la presencia de enfermedad activa (Gennaro *et al*, 2000; Chan *et al*, 2000).

Los test serológicos tienen ciertas ventajas, ya que se pueden usar cuando el paciente no es capaz de producir un esputo adecuado, cuando los cultivos de las muestras son negativos y en la TB extrapulmonar. Este tipo de métodos diagnósticos se desarrollaron desde 1898, cuando se usaron preparaciones que contenían carbohidratos, lípidos y proteínas de *M. tuberculosis* o *M. bovis* BCG, como preparaciones de antígenos, mostrando una alta sensibilidad pero baja especificidad (Arloing *et al*, 1898). El desarrollo moderno en la purificación de antígenos, la producción de anticuerpos monoclonales y las técnicas de cromatografía, han dado lugar a una mejoría en la especificidad. Durante las tres últimas décadas, una gran número de antígenos purificados (nativos y recombinantes) han permitido progresar en el serodiagnóstico de la TB (Jackett *et al*, 1988).

A pesar de un gran número de estudios publicados los pasados años, los métodos serológicos no se usan en el diagnóstico rutinario de la TB, aunque son métodos rápidos y no necesitan muestras de la localización de la enfermedad. Estos tests pueden estar influidos por factores como la edad, la vacunación por BCG y la exposición a otras micobacterias no tuberculosas.

En los últimos años se ha producido un gran avance en el diagnóstico serológico de la TB. El ELISA es una técnica rápida, que proporciona resultados reproducibles y con buena sensibilidad. De momento y a pesar de los progresos, desconocemos la dinámica de aparición y vida media de las inmunoglobulinas en la TB, así como también qué antígenos pueden ser de mayor utilidad. Tampoco conocemos por qué algunos pacientes con TB activa no tienen concentraciones detectables de anticuerpos en el momento de diagnosticarse la enfermedad.

Hasta que estas cuestiones no estén completamente aclaradas, el diagnóstico serológico de la TB no parece estar recomendado para uso general.

5.2.5. Análisis de los ácidos micólicos de la pared.

- **Cromatografía de capa fina**

Las micobacterias se caracterizan por poseer una pared celular extraordinariamente rica en lípidos. Algunos de estos lípidos (como los ácidos micólicos de cadena larga) son característicos de este género, encontrándose además diferencias cuantitativas y cualitativas en la composición lipídica de las diferentes especies. Los ácidos micólicos pueden separarse con relativa facilidad en su forma de ésteres metílicos por cromatografía en capa fina en gel de sílice, dando patrones cromatográficos que permiten separar las micobacterias en grupos, como resultado de la diferente afinidad de las

moléculas por el solvente. Esta técnica se usa más para taxonomía que para diagnóstico.

- **Cromatografía de gases**

En este tipo de cromatografía un gas (la fase móvil) se usa para mover la muestra a través de un líquido (la fase fija) que está en una columna.

Una vez que los lípidos se han extraído de una cepa de micobacterias se inyectan en la columna, las altas temperaturas de la columna (unos 300°C) dan lugar a metil-ésteres saturados en los carbonos 22-24 y 26 de los ácidos micólicos. El reconocimiento de los diferentes productos obtenidos se realiza normalmente mediante espectrometría de masa. Cada especie muestra un patrón determinado que permite su diferenciación (Guerrant *et al*, 1981; Lambert *et al*, 1986)

El principal problema consiste en su limitada reproducibilidad inter-laboratorio y la complejidad metodológica.

5.3. TÉCNICAS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO

5.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis (Mullis, 1986), que se utiliza para obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, a partir de un bajo número de copias de dicho fragmento.

Desde el descubrimiento por Mullis de la PCR en 1983 hasta nuestros días, probablemente ninguna técnica de laboratorio ha evolucionado tanto en tan poco tiempo, ni ha aportado tanta información al conocimiento científico. Sus aplicaciones han ido desde la secuenciación del genoma, la identificación de nuevos genes y polimorfismos, hasta el análisis cuantitativo de expresión y el conocimiento de anomalías cromosómicas.

En sus inicios, el estudio de un gen mediante PCR era meramente cualitativo, tan sólo podíamos hablar de la presencia o ausencia del mismo. A finales de 1980 y principios de 1990 surgen las primeras tentativas para cuantificar la expresión o cantidad de DNA presente en una muestra. Pero es realmente con el desarrollo de la técnica de PCR en tiempo real (PCRtr) a finales de 1990 y principios del nuevo siglo, cuando la cuantificación se hace de forma más segura y alcanza su verdadera relevancia.

La PCR fue presentada a la comunidad científica por su descubridor Kary Mullis en una conferencia en octubre de 1985 (Mullis, 1986).

En la revista *Scientific American*, Mullis resumió el procedimiento: "Comenzando con una única molécula del material genético DNA, la PCR puede generar 100 billones de moléculas iguales en una tarde. La reacción es fácil de hacer, no requiere más que un tubo de ensayo, unos pocos reactivos simples y

una fuente de calor." Fue premiado con el Premio Nobel de Química en 1993 por su invención, y siete años después, él y sus colegas llevaron a la práctica su propuesta. Sin embargo, han aparecido controversias y diferentes versiones sobre las contribuciones intelectuales y prácticas de otros científicos al trabajo de Mullis, y sobre si él fue el inventor único del principio de la PCR (Mullis, 1990).

Durante la década de los 90, la PCR fue mencionada en aproximadamente 10.000 publicaciones científicas por año como promedio.

5.3.1.1. Fundamentos

La técnica de PCR se fundamenta en la propiedad de algunas DNA polimerasas para replicar hebras de DNA, no sufriendo degradación con altas temperaturas. Con alta temperatura se separan por desnaturalización las hebras de DNA y, a continuación, la disminución de la temperatura permite que vuelvan a unirse a oligonucleótidos cebadores, formando un complejo reconocido como sustrato por la polimerasas que vuelve a duplicarlas (Barken *et al*, 2007).

Puesto que las temperaturas de desnaturalización del DNA en cada ciclo son del orden de los 95 °C, deben emplearse DNA polimerasas termoestables, inicialmente extraídas de microorganismos adaptados a vivir a altas temperaturas, que, por otro lado, son restrictivas para la mayoría de los seres vivos.

En la naturaleza, la mayoría de los organismos copian su DNA de la misma manera. La PCR imita ese proceso en un tubo de ensayo. Cuando una célula se divide, las enzimas denominadas polimerasas realizan una copia de todo el DNA presente en cada cromosoma. El primer paso de este proceso es separar las dos cadenas del DNA de la doble hélice. Cuando las dos cadenas están separadas la enzima polimerasa presente en la célula hace una copia usando cada cadena como molde.

Hace 25 años, nadie hubiera imaginado que una bacteria que habita en las aguas termales del Parque Nacional Yellowstone del estado de California, Estados Unidos, podría disparar una técnica de laboratorio revolucionaria. Esta bacteria, la *Thermus aquaticus*, posee una enzima que es termorresistente y que es capaz de producir millones de copias de un único fragmento de DNA en cuestión de horas (Holland *et al*, 1991).

Otros microorganismos de los que se emplean las DNA polimerasas, generalmente arqueas, son: *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent) y *Thermus thermophilus* (Tth).



Figura 24: Termociclador.

El proceso de la PCR se realiza en el aparato denominado termociclador, que permite la programación de ciclos sucesivos de calentamiento y enfriamiento de forma controlada.

Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, para favorecer una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcancen rápidamente las temperaturas programadas (Woods, 2002).

5.3.1.2. Aspectos técnicos

La PCR se basa en la amplificación enzimática selectiva de secuencias de DNA que se encuentran en poca cantidad produciendo grandes cantidades de DNA de longitud y secuencia definida, mediante un termociclador y ciclos consecutivos de desnaturalización, hibridación de iniciadores con el gen diana y extensión de la nueva molécula creada (Figura 23).

La reacción de amplificación de DNA requiere (Sambrook *et al*, 2001):

- Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), son la materia prima de las nuevas cadenas a sintetizar, sustrato para polimerizar nuevo DNA.
- Dos iniciadores (*primers*), oligonucleótidos que son dos oligonucleótidos monocadena cada uno, complementarios a cada una de las dos hebras del DNA respectivamente. Son secuencias cortas, normalmente de 18 a 22 nucleótidos. Deben estar situados enfrentados y a no mucha distancia (generalmente un máximo 4 Kb), delimitando la zona de DNA a amplificar.
- Iones divalentes. Se suele usar magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), o algún otro catión divalente.
- Iones monovalentes, como el potasio.
- Una solución tampón que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la DNA polimerasa.
- DNA polimerasa o mezcla de distintas polimerasas, que suelen tener una temperatura óptima de actividad de alrededor de 70 °C (la más común es la Taq polimerasa).
- DNA molde, que contenga la región de DNA que se quiera amplificar.

El proceso de PCR consiste en aproximadamente 20 a 35 ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 cambios de temperatura. La repetición de las anteriores etapas origina un aumento logarítmico de la región de DNA que se busca amplificar, que está delimitada por los iniciadores.

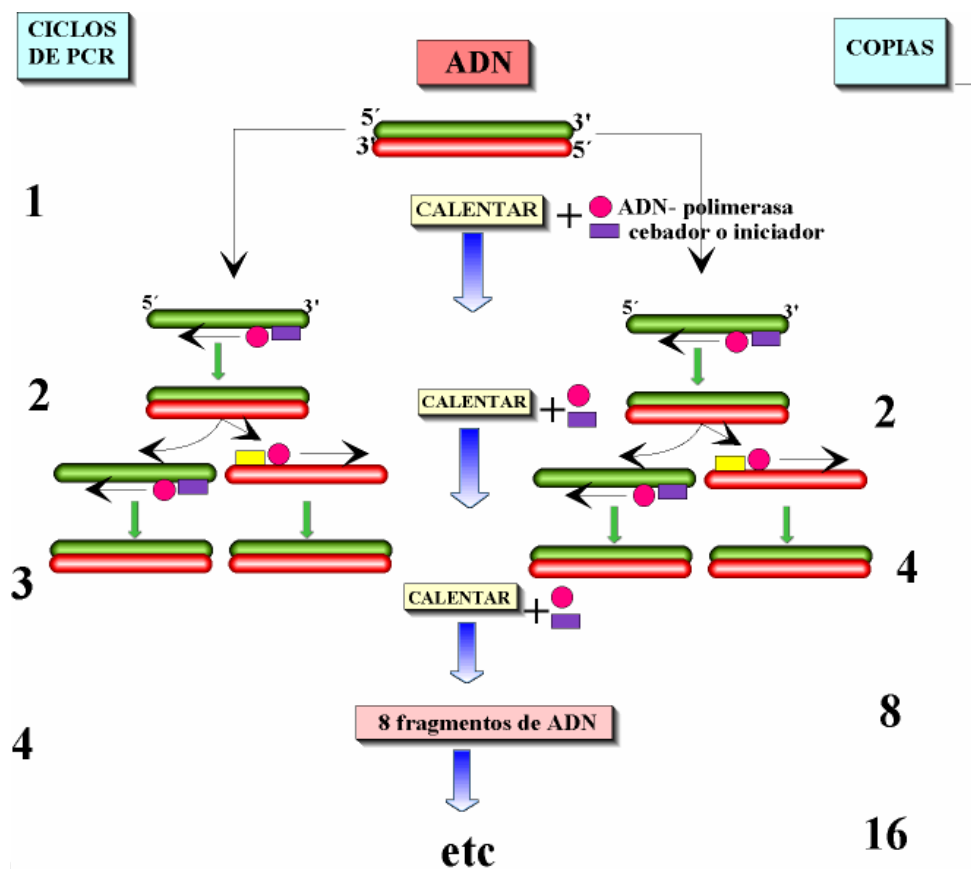


Figura 25: Esquema de la reacción de PCR

Esta técnica multiplica una porción de DNA del orden de 10^6 - 10^9 copias lo que le confieren su altísima sensibilidad.

La PCR convencional consta de las siguientes etapas (Schmittgen, 2001; Wilhelm *et al*, 2003):

1. Inicialización

Este paso consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96°C (ó 98 °C si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos. Esto sólo es necesario para DNA polimerasas que requieran activación por calor.

2. Desnaturalización

En primer lugar, se desnaturaliza el DNA (se separan las dos hebras de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95°C) de la muestra la forma más habitual. La temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende de la proporción de G+C que tenga la hebra, también de la longitud de la misma.

3. Anillamiento

La siguiente fase es la hibridación. El iniciador se unirá a su secuencia complementaria en el DNA molde. Para ello es necesario bajar la temperatura hasta 50-65°C (la temperatura depende de las secuencias de los iniciadores) durante 20-120 segundos, permitiendo así el anillamiento entre cada iniciador y su hebra complementaria. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de DNA (unión DNA - DNA) sólo se forman cuando la secuencia del iniciador es homóloga a la secuencia del DNA molde. La polimerasa necesita el híbrido formado por la cadena molde y el iniciador para empezar a sintetizar el DNA. Los iniciadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

4. Polimerización o elongación de la cadena

La DNA polimerasa se une al complejo hebra-iniciador y toma la hebra de DNA como molde para sintetizar la cadena complementaria, partiendo del iniciador, para la síntesis de nuevo DNA. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTPs complementarios en dirección 5' → 3', uniendo el grupo 5'- fosfato de los dNTPs con el grupo 3'- hidroxilo del final de la hebra de DNA creciente. La temperatura para este paso dependerá de la DNA polimerasa que usemos. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está en 70-80 °C (comúnmente 72 °C). El tiempo de extensión depende tanto de la DNA polimerasa usada como de la longitud del fragmento de DNA que se va a amplificar. Hay una regla básica: en su temperatura y condiciones de reacción óptimas, la polimerasa sintetizará mil bases de DNA por minuto.

5. Elongación Final

Etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que no queden pendientes de síntesis ninguna cadena complementaria ni cualquier DNA de cadena simple quede restante.

Para conservar la reacción a corto plazo, las muestras amplificadas se pueden mantener entre 4-15 °C durante un tiempo indefinido.

Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de DNA previsto, se emplean técnicas de electroforesis, que separan los fragmentos de DNA generados de acuerdo a su carga y tamaño. Generalmente se emplea la visualización mediante electroforesis en gel de agarosa seguida de tinción. El tamaño de los productos de la PCR se confirma utilizando un marcador de peso molecular de DNA que se corre en el gel junto con los productos de PCR.

5.3.1.3. Optimización de la PCR

La correcta amplificación de la región de interés depende de la cantidad y calidad del DNA molde. Algunos compuestos (por ejemplo, fenol y detergentes) pueden inhibir la actividad de la polimerasa.

La cantidad de DNA molde depende en parte de la diana a amplificar. Por ejemplo, si se desea amplificar un gen de una sola copia se emplean cantidades entre los 100 - 500 ng. En el caso de la amplificación de genes repetidos se puede disminuir la cantidad de molde a los 10 - 50 ng.

La concentración de magnesio es otro factor que afecta al funcionamiento del enzima Taq polimerasa. Su carencia puede inactivar el enzima y su exceso reducir la fidelidad de lectura incrementando las uniones inespecíficas. Por ello, suele ser necesario determinar la concentración óptima de $MgCl_2$, que generalmente se utiliza dentro del rango de 1.5 a 3.0 mM.

En ocasiones se hace necesario el uso de aditivos, que ayudan a aumentar la especificidad y fidelidad de la PCR. La adición de betamina, dimetilsulfóxido y formamida es beneficiosa cuando el DNA molde posee regiones ricas en GC (Higuchi *et al*, 1991)

Otros parámetros de la reacción que requieren optimización son la temperatura y el tiempo de anillamiento. Habitualmente se emplea un tiempo de anillamiento de 30 a 60 segundos. Incrementos de 2 a 3 minutos tienen una influencia negativa en la reacción.

Las secuencias de los iniciadores determinan la temperatura de anillamiento óptima de la PCR. Cuando los iniciadores tienen una temperatura de fusión (T_m) alta, se recomienda aumentar la temperatura de anillamiento, pues de esta forma se reducen al mínimo las uniones inespecíficas, aumenta la cantidad de producto amplificado y se reduce la formación de dímeros de iniciadores. Ambos cebadores deben tener una T_m similar.

Un aspecto muy importante a tener en cuenta cuando se trabaja con esta técnica, es evitar contaminaciones. Además de las reglas de funcionamiento y manipulación especialmente importantes en diagnóstico, existen procedimientos que resultan útiles para evitar los problemas de contaminación (Kaltenboeck *et al*, 2005):

- Utilización de reactivos y material de un solo uso.
- Colocación de controles de agua de forma aleatoria en las reacciones.
- Uso de solución de hipoclorito de sodio al 10% aplicado sobre las superficies inertes de trabajo.
- Aplicación de luz UV (254 y 300 nm) a superficies y materiales que degrade los posibles amplicones anteriormente obtenidos.
- Método de la uracil-N-glicosilasa (UNG). Este método se basa en el reemplazo de d-TTP por d-UTP en la reacción de PCR. El DNA que contiene d-UTP será sustrato para la UNG, permitiendo que esta enzima elimine el DNA proveniente de amplificaciones previas (amplicones), sin afectar a aquel que hubiera en la muestra. La digestión con UNG debe realizarse como paso previo a la amplificación.
- Si se producen dímeros de iniciadores, compiten con el producto y dan una menor eficacia en la amplificación.

- Otro problema asociado a la PCR es la inhibición de la reacción, que da lugar a resultados falsamente negativos. Entre las causas que inhiben la PCR pueden mencionarse:

- ❖ Defectos en la preparación y/o conservación de la muestra
- ❖ Extracción defectuosa del material genético a analizar
- ❖ Errores al pipetear
- ❖ Presencia de inhibidores: la utilización de heparina inhibe la actividad de la DNA polimerasa termoestable, quelantes como el EDTA pueden capturar el magnesio necesario para el desarrollo de la reacción, la presencia de trazas de alcohol tras la extracción de los ácidos nucleicos también pueden inhibir la reacción de amplificación, etc.

5.3.1.4. Tipos de PCR

Una de las mayores ventajas de la PCR es su gran versatilidad que posibilita una amplia gama de variantes para ser aplicada a diferentes objetivos. Algunas de estas variantes son (Schmittgen. 2001; Wilhelm *et al*, 2003):

1. PCR anidada

Para incrementar la sensibilidad de la PCR, el producto de una amplificación puede utilizarse como molde para realizar una segunda amplificación con iniciadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada. Este tipo de PCR también incrementa la especificidad de la reacción.

2. PCR *in situ*

PCR realizada sobre preparaciones fijas sobre un portaobjetos. La PCR *in situ* consiste en una reacción de PCR en secciones histológicas o células, donde los productos generados pueden visualizarse al microscopio en el sitio de amplificación. En la técnica de PCR *in situ* se realiza una primera amplificación de DNA, pudiendo también procederse a una hibridación *in situ* posterior, con sondas de DNA o RNA.

3. PCR multiplex

PCR en la cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción. Combina en una única reacción todos los pares de iniciadores de las regiones que queremos amplificar simultáneamente, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes. Las ventajas que aporta son que se obtiene la información de varios loci en una sola reacción.

4. RT-PCR

Cuando el molde inicial es RNA, se requiere de una reacción de retro-transcripción con transcriptasa inversa que realice la conversión del RNA a DNA complementario (cDNA). Este cDNA servirá de molde para la PCR.

5.3.1.5. PCR en tiempo real (PCRtr)

Es la reacción de PCR cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de DNA presente en la muestra original.

La diferencia principal con la PCR convencional radica en que mientras en la primera el producto genético amplificado debe analizarse al final de la reacción, en la PCRtr es posible determinar el resultado de la amplificación sin requerirse ningún procesamiento posterior de los amplicones. Esto se realiza determinando el ciclo de la PCR en el que la señal de fluorescencia de una determinada muestra sobrepasa un umbral mínimo o basal previamente establecido. Este ciclo es denominado punto de cruce o *Crossing point* (C_p) que indica el ciclo umbral o *threshold cycle*. (C_T) (Wong et al, 2005).



Figura 26: Termociclador Light Cycler para PCRtr

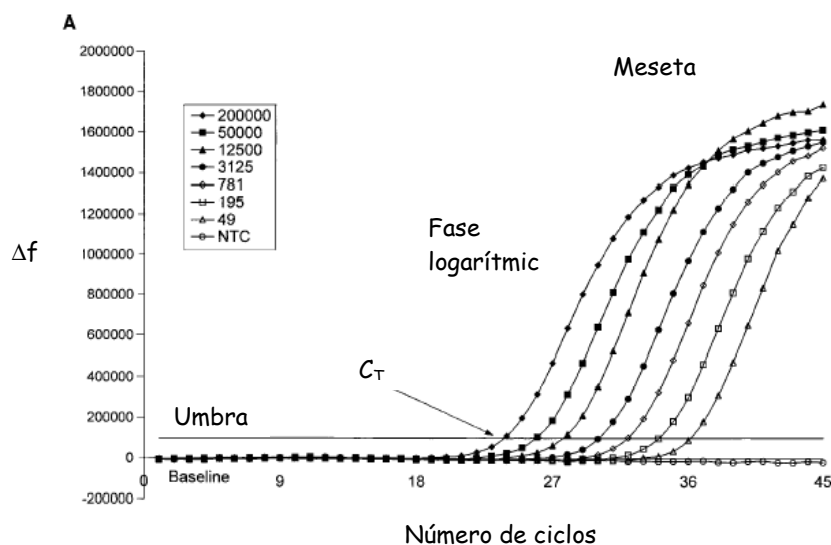


Figura 27: Fases de la PCR en tiempo real. C_T : ciclo umbral.

El ciclo en el que se empieza a detectar fluorescencia para un determinado gen es proporcional a la cantidad de dicho gen presente en la muestra original. Cuanto mayor sea la cantidad inicial del gen diana, menor será el ciclo en el que la fluorescencia sea detectada.

Existen dos métodos fundamentales de cuantificación:

1. Cuantificación absoluta, cuando se emplean curvas estándar o patrón, son realizadas normalmente con plásmidos o DNA de referencia, a distintas concentraciones.

2. Cuantificación relativa, cuando se emplea una muestra calibrador a la que damos el valor 100 %, normalmente una línea celular o bien la muestra del paciente al diagnóstico, y sobre este 100% cuantificamos de forma relativa la muestra en estudio.

Para la detección del producto amplificado se utilizan varios métodos, que varían dependiendo del tipo de aplicación seleccionada.

El método más generalmente utilizado emplea un fluorocromo inespecífico (SYBR Green) capaz de unirse a cualquier molécula de DNA de doble cadena. La doble cadena que se va sintetizando en cada ciclo, se une al fluorocromo produciendo fluorescencia que es detectada y cuantificada. Este método permite cuantificar sólo una secuencia por reacción pero tiene la ventaja de su menor coste y mayor rango de aplicabilidad.

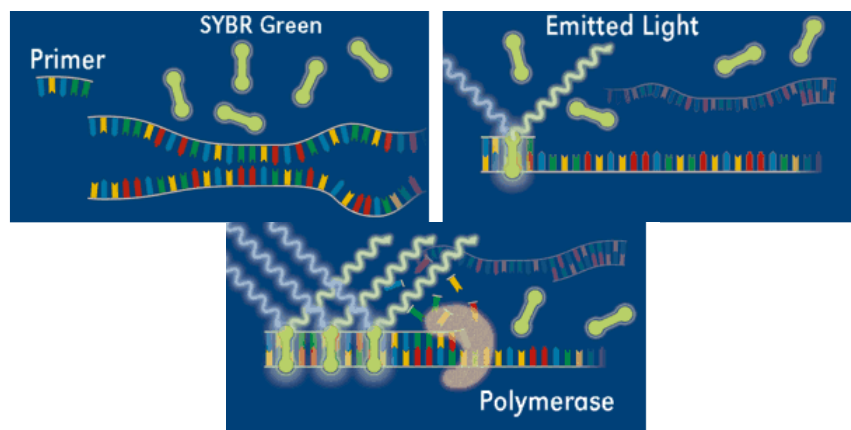


Figura 28: Fluorescencia mediada por SYBR Green I

Primero la molécula de DNA está libre y no emite fluorescencia. La emisión comienza con la acción de la polimerasa al unirse el SYBR Green al DNA de doble cadena, que se acumula. Para la cuantificación con SYBR Green la medida de fluorescencia se realiza al final del paso de la elongación. El software del termociclador calcula el incremento de fluorescencia y estos datos se representan frente al número de ciclos. Al inicio de la reacción los valores de fluorescencia no exceden la basal, pero van aumentando a medida que aumenta la cantidad de producto. El nivel umbral elegido se basa en la variabilidad de la línea base durante los primeros ciclos. Este umbral puede variarse manualmente en cada experimento. El ciclo umbral de cada muestra se calcula determinando el punto al cual la fluorescencia excede el umbral elegido (Ponchel *et al*, 2003).

Otros métodos emplean sondas marcadas con fluorescencia, que o bien pueden unirse a la secuencia amplificada de forma específica, o ser usados como iniciadores.

Una vez realizada la PCRtr los resultados obtenidos deben analizarse para confirmar que la reacción se ha llevado a cabo correctamente y determinar la cuantificación de la diana presente en la muestra inicial.

Cuando se utiliza la detección del amplicón con SYBR Green, debe determinarse la curva de fusión de los amplicones para confirmar una amplificación específica. El análisis del punto de fusión de los amplicones (melting point) permite conocer la especificidad de los productos amplificados. La temperatura de fusión depende de la longitud de la secuencia amplificada, del contenido en G+C y de la propia secuencia de nucleótidos. Por lo tanto, un dímero de iniciadores tiene una temperatura de fusión menor normalmente que la del producto amplificado debido a su menor tamaño.

La cuantificación se representa gráficamente como el nivel de fluorescencia emitido en relación al número de ciclos. Debe determinarse en la fase logarítmica o exponencial de síntesis de los amplicones, puesto que el nivel de fluorescencia aumenta de forma exponencial a partir de un determinado umbral, conforme van pasando los ciclos y aumenta la cantidad de producto amplificado. La cuantificación se debe realizar en la fase de la curva, en la que la fluorescencia es proporcional a la cantidad de diana en la muestra.

Ventajas de la PCRtr respecto a la PCR convencional (Klein, 2002; Bastien *et al*, 2008):

1. En la PCRtr la amplificación y la detección de las muestras están integradas y son simultáneas, es decir, la detección se realiza a medida que se va sintetizando el producto, lo cual permite seguir el proceso paso a paso y, por lo tanto, tener un control sobre la reacción. En la PCR convencional ambos procesos están separados.
2. El tiempo de duración del ensayo para la PCRtr varía de acuerdo a si se utilizan tubos capilares o eppendorf entre 40 minutos a 2 horas, para la PCR convencional la duración no suele ser menor de 4 horas.
3. Contaminación: en la PCRtr los riesgos de contaminación están significativamente reducidos debido a que se trata de un sistema cerrado.

La aplicación de la técnica de PCRtr en el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis está actualmente en fase de desarrollo.

5.3.2. Otros métodos moleculares

5.3.2.1. Sondas genéticas

Una sonda es un fragmento de DNA que posee una secuencia de bases complementaria a la del genoma de un microorganismo. Las sondas están marcadas con diversos indicadores fáciles de detectar: isótopos radiactivos (sondas calientes) o sustratos cromógenos (sondas frías). Cuando se separan las dos hebras que forman la molécula de DNA, la sonda es capaz de hibridarse con

su fragmento homólogo, si existe. La hibridación de la sonda a su fragmento homólogo se detecta gracias al marcador que se ha incorporado.

Entre las principales ventajas destaca la sencillez de su manipulación. El principal inconveniente es su coste.

Existen un tipo de sondas que se fijan sobre un soporte sólido paralelas en línea (Line Probe Assay [LiPA]). Cada sonda es un fragmento especie-específico de regiones internas del genoma de *Mycobacterium*. El DNA diana se une a la sonda mediante hibridación inversa. Una vez que la hibridación se ha llevado a cabo y se han lavado los fragmentos que no se han pegado a las sondas, la sonda hibridada se ve como una banda coloreada por la acción de una enzima y un sustrato cromógeno. La especificidad de la sonda hibridada se infiere por la posición de la banda coloreada. Hay tres métodos comerciales disponibles: INNO-LiPA MYCOBACTERIA (Innogenetics, Ghent, Belgium), GenoType Mycobacterium (Hain, Germany), y GenoType MTBC (Hain, Germany)

5.3.2.2. PCR-RFLP (PRA)

Este método consiste en realizar una PCR (reacción en cadena de la polimerasa), de 440 pares de bases del gen *hsp65* seguida de un posterior análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) tras la aplicación de 2 enzimas (*BstE* II y *Hae* III) sobre lo amplificado. Los productos digeridos se separan y visualizan en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4%. Este método, de amplia aplicación en la identificación de especies del género, fue descrito en 1993 por el asturiano A.Telenti.

En la página web <http://app.chuv.ch/prasite/index.html> se pueden consultar los patrones de los polimorfismos encontrados para cada especie. El método consigue una identificación rápida (en una jornada laboral), precisa y económica de múltiples cepas. Tiene capacidad discriminar grupos subespecíficos en las diferentes micobacterias. No necesita mucha cantidad de micobacterias y el equipamiento necesario no es excesivamente caro. Aunque está bastante estandarizado, tiene el inconveniente de que no está comercializado ni aprobado por la FDA.

6.- TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

6.1. FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

El tratamiento correcto es la mejor medida de control de la TB. Los fármacos antituberculosos se clasifican en dos grupos en función de su eficacia, potencia, efecto tóxico y tolerabilidad. El primer grupo incluye los llamados de primera línea, que son los utilizados para el tratamiento inicial de la tuberculosis. El segundo grupo lo forman los de segunda línea o de reserva, usados para las formas de tuberculosis resistentes a los anteriores o como alternativa en situaciones clínicas determinadas.

TABLA I. FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

<u>De primera línea</u>	<u>De segunda línea</u>
Rifampicina (R)	Protionamida
Isoniazida (H)	Cicloserina
Pirazinamida (Z)	Capreomicina
Etambutol (E)	Ofloxacino
Estreptomicina (S)	Clofazimina

6.1.1 Esquemas terapéuticos recomendados

El esquema ideal no existe. El tratamiento más idóneo debería reunir los siguientes requisitos:

- Alto poder bactericida.
- Alto poder esterilizante.
- Bajo número de recidivas.
- Bajo coste.
- Buena aceptación y tolerancia.

El que reúne casi todos los requisitos favorables es el de 6 meses de duración: 2 meses con R, H, Z y E, seguidos de 4 meses con R y H (2RHZE/4RH). El mismo esquema sin E es posible que siga siendo válido en las Comunidades Autónomas en las que la tasa de resistencia global a H sea menor del 4%. Aunque provoca un discreto incremento de los efectos secundarios comparativamente con el de 9 meses (2RHE/7RH), se obtienen resultados similares en eficacia, toxicidad y aceptación para ambos, su coste global es inferior y es más cómodo para el paciente. Durante la fase de inducción (dos primeros meses), este esquema es capaz de negativizar más del 80% de los cultivos (American Thoracic Society, 2003; Broakmans et al, 2002).

El esquema mencionado, siguiendo la estrategia de control de seguimiento DOT (Directly Observed Treatment) es el recomendado por la OMS por sus buenos resultados (WHO, 2006).

Con el tratamiento correcto se produce menos del 2% de recaídas tras la finalización; sin embargo, puede ser aconsejable hacer un último control al cabo de un año, con una radiografía de tórax, y recomendar al paciente que en caso de presentar clínica sospechosa acuda de nuevo a consulta. (Lobo *et al*, 2001).

TABLA II. CONTROLES PERIÓDICOS EN EL TRATAMIENTO INICIAL

INICIO	15-30 días	2 meses	4 meses	6 meses
Análisis	Sí	Sí	Sí	-
Radiografía	-	Sí	-	Sí
Espuito	-	Sí	-	Sí
Educación Sanitaria	Sí	Sí	Sí	Alta

6.1.1.1 Tuberculosis extrapulmonar

Excepto las meningitis, todas las tuberculosis extrapulmonares pueden ser tratadas con los mismos regímenes que la tuberculosis pulmonar, ya que la carga bacilar se cree que es similar cualquiera que sea su localización. (American Thoracic Society, 2003; Broakmans *et al*, 2002; WHO, 2003).

6.1.1.2 Tuberculosis infantil

Los niños normalmente presentan una buena tolerancia al tratamiento, por lo que se deben seguir las mismas recomendaciones que para el adulto, ajustando las dosis al peso. Es necesario ajustar correctamente las dosis al peso y evitar en lo posible el Etambutol en niños pequeños por la dificultad que entraña la evaluación de la posible toxicidad ocular. Se aconseja administrar la Isoniazida a la dosis de 5-10 mg/kg sin superar los 300 mg/día. (American Thoracic Society, 2003; Broakmans *et al*, 2002; WHO, 2003).

6.1.1.3. Otros tratamientos coadyuvantes

Los *corticoides* estarán indicados en las siguientes circunstancias:

- Pacientes muy sépticos y con mal estado general.
- Meningitis con focalidad neurológica (estadios II y III).
- Insuficiencia respiratoria aguda por tuberculosis diseminada.
- Reacciones por hipersensibilidad e iatrogenia cutánea debida al tratamiento.

En los demás casos no está demostrada su utilidad (Recomendaciones SEPAR, 2002).

6.1.1.4. Situaciones especiales

Las hemoptisis importantes pueden ser tratadas con éxito mediante embolización de las arterias bronquiales sangrantes, previa identificación con arteriografía. Tras finalizar el tratamiento antituberculoso, los enfermos embolizados que vuelvan a presentar hemoptisis importante procedente de lesiones localizadas deben ser valorados para una posible resección quirúrgica.

En casos muy especiales en los que se han agotado los tratamientos farmacológicos por resistencias y/o toxicidad grave y las lesiones son localizadas, puede realizarse la resección quirúrgica de la zona afectada. Siempre debe ser complementada con el tratamiento farmacológico más eficaz posible, tras la valoración de las pruebas de sensibilidad y la historia clínica (Recomendaciones SEPAR, 2002).

6.1.2 Tratamiento de la infección latente

El objetivo fundamental de la profilaxis en los países con baja incidencia de la enfermedad es el tratamiento de las personas con infección latente, ya que en estas áreas la mayoría de los casos de tuberculosis se producen por reactivación de la infección desde un foco latente más que por contagio con una nueva cepa.

Los pacientes que se benefician de este tipo de tratamiento son los contactos de pacientes con enfermedad activa, pacientes con enfermedades de base que predispongan a desarrollar la enfermedad, así como en condiciones socioeconómicas precarias o inmigrantes venidos de países con alta prevalencia de la enfermedad (American Thoracic Society, 2000).

Antes de iniciar el tratamiento, debe hacerse una historia clínica detallada del paciente para conocer la existencia de enfermedades que predispongan al desarrollo de tuberculosis, como la diabetes mellitus, insuficiencia renal, etc. O bien conocer si el paciente recibió en el pasado algún tratamiento antituberculosos. También debe realizarse una radiografía de tórax que descarte una infección activa en el momento de iniciar la terapia.

La pauta más frecuentemente usada consiste en la administración de INH de forma diaria durante 6-12 meses. Este tratamiento, reduce el riesgo de desarrollar enfermedad por reactivación endógena, pero no protege de una exposición exógena, por ello, en caso de sospecharse o demostrarse una exposición reciente, debe evaluarse en el paciente la necesidad de extender la duración del tratamiento o la instauración de un tratamiento nuevo (Smieja *et al*, 1999)

6.2. RESISTENCIAS

En la práctica clínica, resistencia significa que el enfermo no responderá al tratamiento como lo hace el infectado con bacilos sensibles.

Bacteriológicamente, expresa que en la población bacilar hay una proporción de mutantes resistentes, igual o superior al 1% (nivel crítico preestablecido), que le permite desarrollarse frente a determinados fármacos en concentraciones superiores a la concentración inhibitoria mínima.

La resistencia, en cualquiera de sus formas, invalida los fármacos afectados de forma irreversible.

Un fármaco mal utilizado (monoterapia superior a 15 días), no debe considerarse eficaz aunque resulte sensible en el examen realizado. El desarrollo de la resistencia adquirida es más rápido en la pirazinamida, la rifampicina y la estreptomina, y menos en la isoniazida. Desde el punto de vista clínico, resulta más decisiva la correcta anamnesis de los fármacos tomados anteriormente que el resultado de las pruebas de sensibilidad.

A) Resistencia Primaria

Es la observada en enfermos que nunca han recibido fármacos antituberculosos, es consecuencia de una transmisión desde un enfermo con resistencia adquirida o de una mutación anómala natural.

B) Resistencia Secundaria o Adquirida

Es la provocada por tratamientos incorrectos que eliminan la población sensible y permiten la selección-multiplicación de los mutantes preexistentes.

C) Resistencia Inicial

Comprende la resistencia primaria más la adquirida como consecuencia de tratamientos previos no conocidos, ignorados o falseados.

6.2.1 Tuberculosis Multirresistente y Extremadamente resistente

La multiresistencia se define como la resistencia al menos a H y R. Los pacientes infectados por este tipo de microorganismos suelen tener lesiones pulmonares crónicas y cavidades a las que el antibiótico llega con mucha dificultad. Existen cepas multirresistentes para las que no hay cura. La preocupación de que esas cepas se diseminen por el mundo hace necesarias nuevas medidas, como nuevos métodos diagnósticos, mejores tratamientos y vacunas más efectivas. Los pacientes con tuberculosis multirresistente (MRD-Tb) necesitan un régimen de tratamiento alternativo que incluya fármacos de segunda línea que son más caros, más tóxicos y menos efectivos.

El problema de la tuberculosis extremadamente resistente (XDR-Tb) es reciente, estas cepas fueron definidas recientemente por la WHO como aquellas que muestran resistencia al menos a R y H que es la definición de MDR-Tb, junto con resistencia a alguna fluorquinolona, y al menos a uno de los siguientes tres fármacos: capreomicina, kanamicina y amikacina (http://www.who.int/tb/xdr/taskforcereport_oct06.pdf).

La MDR-Tb y la XDR-Tb constituyen una amenaza para el control de la enfermedad y existe un gran riesgo de una futura expansión de la resistencia,

sobretudo en pacientes infectados por el VIH. (Gandhi et al, 2006) Por esta razón y para permitir la instauración de tratamientos adecuados en los pacientes afectados, la rápida detección de la resistencia a fármacos de primera y segunda línea ha comenzado a ser un punto clave en los programas de control de la TB.

La WHO ha realizado varios estudios, el último en 2004, cubriendo diferentes emplazamientos en los que se ha objetivado que la MDR-Tb estaba presente en la mayoría de las localizaciones y que un buen control de la TB se asocia con niveles menores de resistencia (WHO, 2004; Aziz et al, 2006).

Las prevalencia más altas de MDR se observaron en la Federación Rusa, Uzbekistán, Estonia, China, Lituania, y Ecuador.

La detección de la resistencia a fármacos se realiza mediante tecnologías que incluyen métodos fenotípicos y genotípicos.

Los métodos fenotípicos identifican la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis*, en la presencia de antibióticos y calculando la concentración mínima inhibitoria de las principales fármacos anti TB (Heifets et al, 1996). La definición clásica de resistencia a *M. tuberculosis*: es aquella cepa que desarrolla una susceptibilidad significativamente baja comparada con la cepa salvaje que nunca ha estado en contacto con el fármaco (Canetti et al, 1963; Canetti et al, 1969).

Los métodos genotípicos analizan los genes de resistencia, por medio de amplificación de los ácidos nucleicos (PCR) y detectando productos amplificados de mutaciones específicas, que se correlacionan con la resistencia al fármaco (García de Viedma et al, 2003; Palomino et al, 2005).

Las diferentes pautas para tratar la MDR-Tb, incluyen 5 fármacos: un agente de primera línea al que la cepa sea sensible, un agente inyectable (aminoglucósido), una quinolona de tercera generación (que se han hecho fundamentales en estos tratamientos debido a su excelente biodisponibilidad por vía oral y a su gran actividad bactericida) y dos o más antituberculosos de segunda generación que deben emplearse a la mayor dosis posible (Frieden et al, 2003; Mukherjee et al, 2004).

6.3. NUEVOS TRATAMIENTOS ANTITUBERCULOSOS

El tratamiento de la Tuberculosis ha sufrido muy pocas modificaciones desde el descubrimiento de los primeros fármacos activos hace más de 40 años. De hecho, el aparente control de la enfermedad en los países industrializados hizo que las empresas farmacéuticas perdieran interés en nuevos desarrollos de fármacos antituberculosos. El problema fue evidente cuando surgió la asociación HIV-TB y las dificultades derivadas de la asociación de tratamientos farmacológicos en dicha entidad (www.tuberculosisistextbook.com).

En el año 2000 se estableció la *Global Alliance for TB Drug development* (<http://new.tballiance.org>) con la finalidad de promover el desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos.

En la actualidad, con el apoyo de ésta y otras iniciativas existen varios fármacos antituberculosos, en diferentes fases de desarrollo, que representan un futuro prometedor en la mejora del tratamiento actual:

- **Moxifloxacino.** Es una nueva fluorquinolona que permitiría acortar la duración actual del tratamiento al ser utilizada en sustitución a isoniazida o etambutol (Burman *et al*, 2006).
- **PA-824.** Es un pro-fármaco del tipo del nitroimidazol que se encuentra también en fase de ensayo clínico (Nuermberger *et al*, 2006).
- **1.5.3 R207910.** Es una diaril-quinolona que presenta un modo de acción nuevo, la inhibición de la ATP-sintetasa, y es muy activa frente a *M. tuberculosis* y otras micobacterias (Andries *et al*, 2005).

6.4. PROFILAXIS

Existen dos estrategias diferentes para controlar la aparición de la tuberculosis. La primera es la vacunación y la segunda el tratamiento de las personas con infección latente.

6.4.1 Vacunación

La vacuna frente a la tuberculosis actualmente en uso, está compuesta de la cepa atenuada BCG, perteneciente a la especie *M. bovis*. Aunque la eficacia de la BCG sigue siendo discutida, la BCG viva atenuada es la única vacuna actualmente en uso para prevenir la TB en humanos porque es efectiva frente a formas severas de TB y su uso previene un gran número de muertes que serían causadas por la TB todos los años. La vacunación no previene la infección, sino de la progresión hacia la enfermedad clínica. Su empleo en la población infantil ha supuesto una importante disminución de la incidencia, entre el 60-80%, de formas graves de tuberculosis, como meningitis y tuberculosis diseminada, en este grupo de población. En cambio no se ha mostrado tan eficaz en la prevención de la enfermedad en adultos.

La vacuna de la BCG es recomendada por la WHO en países con alta incidencia y prevalencia de TB, (http://www.who.int/vaccine_research/diseases/tb/en). Actualmente es obligatoria en al menos 64 países y es administrada en más de 167. La BCG continúa siendo la vacuna más usada en el primer mundo (<http://www.cdc.gov/nchstp/tb/pubs/tbfactsheets/250120.htm>).

La vacunación se utiliza como medida profiláctica en niños de áreas de alta prevalencia de la enfermedad y de áreas de menor prevalencia pero con alto riesgo de exposición al bacilo tuberculoso, debido a su situación social o económica.

También confiere protección contra la lepra e incluso ha sido autorizada como un tratamiento para el cáncer. El nivel de protección conferido por la BCG es muy variable según la forma de TB o bien si se asocia a infección por VIH, así como comparando diferentes poblaciones.

Desde 1921 cuando la BCG fue usada por primera vez, varios laboratorios a lo largo del mundo han continuado cultivando BCG, dando lugar a la aparición de diferentes variantes, como la BCG Pasteur, BCG Moscú o la BCG Brasil. Estas cepas de BCG son diferentes unas de las otras y con sus antecesores, por lo que es prudente referirse a las vacunas de la BCG en plural. Las diferencias en la protección y efectividad podrían deberse a las variaciones entre las cepas, y por esta razón la WHO ha recomendado la liofilización de los stocks de las vacunas y su almacenamiento a - 80° C (Behr *et al*, 2002).

La elección de la cepa de BCG que se debe usar para la vacuna es muy importante. Es necesario realizar un análisis detallado del genoma y la inmunogenicidad de las diferentes sub-cepas de BCG para identificar la sub-cepa que da la mayor protección y recomendarla para futuras vacunas en el mundo (Corbel *et al*, 2004).

Debido a que los humanos son el único reservorio de *M. tuberculosis*, el desarrollo de vacunas más efectivas que BCG podría, teóricamente, hacer posible la erradicación completa de la enfermedad tuberculosa (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00054407.htm>).

Durante la última década se ha investigado en el desarrollo de vacunas mejoradas de TB y se han propuesto más de 200 candidatas. Por primera vez, después de 80 años de uso mundial de BCG, se están probando nuevos tipos de vacunas:

- Las vacunas de **BCG recombinantes** pueden ser útiles para el desarrollo de una vacuna más efectiva que la BCG.
- Las **vacunas por subunidades** son más seguras y son buenos candidatos para mejorar el efecto de la BCG. Pero no han demostrado conferir una mejor protección que la BCG en los ensayos preclínicos, por lo que han sido propuestas para usarse como potenciadoras de la BCG.
- **Vacunas de *M. tuberculosis* vivas atenuadas**. Estas vacunas imitan la infección natural tanto como es posible sin causar la enfermedad (Young *et al*, 2003).

Los avances en el conocimiento del genoma de las especies de micobacterias (Cole *et al*, 1998), y el desarrollo tecnológico (Clark-Curtiss *et al*, 2003), han permitido construir cepas transformantes de BCG que incluyan genes altamente inmunogénicos o genes que favorezcan la actividad inmunogénica de la bacteria (Martin, 2006). La inactivación de determinados genes permite una mejor atenuación de *M. tuberculosis* (Pelicic *et al*, 1997).

El objetivo de conseguir una vacuna efectiva para el año 2015 ha sido propuesto por Stop TB/WHO. Se estima que al menos 20 vacunas son

candidatas a entrar en los ensayos de seguridad Fase I, con al menos la mitad alcanzando la evaluación inmunológica en los ensayos de Fase II, quedando cuatro que puedan llegar a los ensayos de eficacia Fase II (Young *et al*, 2006). Se estima que para el año 2050 las nuevas vacunas puedan contribuir eficazmente a la eliminación de la TB en el mundo.

Se estima que un tercio de la población en todo el mundo está infectada por *M. tuberculosis*. De modo que cualquier nueva vacuna debe proteger de la pre-exposición, evitando que la gente desarrolle la infección y de la post-exposición, evitando que individuos sanos con infección latente desarrollen la enfermedad. Es decir, debería ser usada como un agente inmunoterápico para que actúe como antimicrobiano para aumentar la tasa de aclaramiento de *M. tuberculosis*.

TABLA III. DESAFÍOS EN EL DESARROLLO DE NUEVAS VACUNAS

(Martín *et al*, 2005)

Un tercio de la población mundial está infectada con TB.	Las nuevas vacunas deben ser preventivas e inmunoterapéuticas.
La co-infección con VIH requiere más seguridad.	Las vacunas deben ser tan atenuadas tanto o más que la BCG.
Un gran porcentaje de la población está vacunada con BCG.	Las nuevas candidatas a vacunas deben ser probadas en una población vacunada previamente con BCG.

Un desafío adicional es que un gran porcentaje de la población ha sido inmunizada previamente con BCG por lo que cualquier nueva generación de vacunas contra TB debe ser también capaz de proteger a la población que ha sido vacunada previamente. Las vacunas deben también ser lo suficientemente seguras como para ser usadas en pacientes infectados por VIH (Vuola *et al*, 2003).

De todas maneras el desarrollo de una vacuna que confiera una mejor protección que la BCG y que sea capaz de reemplazarla continúa siendo un desafío para la comunidad científica.

Recientemente, se ha descrito la eficacia en el tratamiento de la infección latente de un derivado de *M. tuberculosis* que se administra como vacuna terapéutica (Cardona, 2007).



7.- LATENCIA DE LA TUBERCULOSIS

Durante la infección por *M. tuberculosis* se produce una respuesta inmune en la que, incluso si la infección se controla y no hay enfermedad, no todos los bacilos son eliminados. Algunas bacterias permanecen en los tejidos en un estado denominado de latencia. *M. tuberculosis*, posee la capacidad de sobrevivir en condiciones adversas durante largos periodos de tiempo (Dahl, 2005).

De manera general se acepta que, durante el contacto de un organismo patógeno con su hospedador, se desarrolla una adaptación mutua que conduce a una cierta atenuación del patógeno necesaria para permitir la supervivencia del hospedador, como forma de asegurar su propia supervivencia. La estrecha relación que los bacilos tuberculosos han tenido y tienen con el ser humano como único hospedador, ha influido, muy probablemente, en que se haya desarrollado una compleja interconexión, dando lugar a un proceso patológico también complejo que posibilita la supervivencia mutua.

7.1. CONCEPTO DE LATENCIA

Para definir la persistencia microbiana nos hemos de remontar al año 1950 cuando McCune la define como el fenómeno por el cual un microorganismo susceptible a fármacos, tiene la capacidad de sobrevivir indefinidamente. La Persistencia es la capacidad de sobrevivir en condiciones adversas (presencia de antibacterianos) con actividad metabólica baja. Puede formar o no colonias en cultivo.

Respecto al concepto de latencia bacilar (dormancy) se ha definido como "el estado reversible de baja actividad metabólica durante el cual las células persisten durante largos períodos sin dividirse" (Kaprilyants *et al*, 1993). Es el estado metabólico más básico, inducido por la falta de nutrientes, las bajas temperaturas, un pH ácido o la falta de oxígeno. Son bacilos viables que pueden resucitar si se dan las condiciones apropiadas (Barer *et al*, 1999).

La latencia, como proceso infeccioso, se refiere a una situación clínica de equilibrio a la que llegan los bacilos en el hospedador sin causar síntomas aparentes. Según esta definición, los conceptos de latencia y de persistencia bacilar son convergentes e identifican una misma condición biológica del bacilo: ausencia o enlentecimiento de la división bacteriana.

El ciclo de división de los microorganismos presenta 4 fases: interfase, fase exponencial, fase estacionaria, fase de muerte (Kolter *et al*, 1993). El comportamiento del bacilo en fase exponencial está muy bien caracterizado, pero poco se sabe del comportamiento del bacilo durante la fase estacionaria del ciclo micobacteriano. Si transferimos un inóculo de micobacterias a un medio nuevo, no crece inmediatamente, sino que necesita una fase de adaptación para posteriormente comenzar a crecer exponencialmente. A continuación se estabiliza el sistema a una fase estacionaria donde el crecimiento cesa por falta de nutrientes y/o acumulación de productos tóxicos (Nystrom, 2001). Esta fase se caracteriza por presentar poblaciones bacilares heterogéneas en morfología y en estado metabólico (Smeulders *et al*, 1999; Garton *et al*, 2002).

Según Kaprelyants, para poder entender bien el estado de latencia, hay que definir los términos de bacilo viable y bacilo cultivable. La viabilidad es la capacidad por la que los organismos pueden crecer hasta un nivel detectable (por ejemplo, formar colonias en una placa de agar). De esta forma, podemos calcular las UFC (Unidades formadoras de colonias). Es lógico extrapolar que si un bacilo no es cultivable habría que considerarlo no viable o muerto, pero hay que tener en cuenta la capacidad del organismo de crecer en el tiempo de incubación y las condiciones que se le ofrecen en ese momento determinado. Hay ejemplos en los que las bacterias que no podemos cultivar en cierto momento, y que han sido cultivables más tarde. Algunas de estos ejemplos pueden ser el estado de latencia que adoptan los bacilos que no presentan ningún signo de vida pero que son capaces de adquirir un estado fisiológico activo posteriormente. Bajo ciertas circunstancias, los bacilos que son normalmente cultivables pasan a ser no cultivables pero mantienen su viabilidad.

Este autor define a los bacilos cultivables desde dos puntos de vista: los que son inmediatamente cultivables, de un modo sencillo basado en medios convencionales y los no cultivables si no son en condiciones especiales que requieren protocolos alternativos a los métodos clásicos.

7.2. LA LATENCIA EN *M. tuberculosis*

Tuberculosis latente es el síndrome clínico que ocurre tras la exposición de un individuo a *M. tuberculosis* y la creación de una respuesta inmune eficaz. La latencia es la situación predominante en la infección por *M. tuberculosis*, describiéndose clínicamente como la existencia de infección sin signos ni síntomas de enfermedad (Ulrichs *et al*, 2005). La presencia de la memoria

inmune se puede diagnosticar en forma de una reacción positiva al PPD, de modo que la existencia de reacción positiva en un individuo sin enfermedad, se considera que define el estado latente (Nuemberger et al, 2004). Actualmente la existencia de memoria inmune puede determinarse por análisis *in vitro* (ver Apartado 4.2- Diagnóstico Clínico de la Infección Tuberculosa).

Aproximadamente el 60% de las personas que se infectan por *M. tuberculosis* son capaces de crear una respuesta inmune efectiva frente al germen y por tanto desarrollan latencia, pero existen circunstancias que pueden alterar el curso normal haciendo que entre el 2 y el 23% de los pacientes con tuberculosis latente desarrollen una reactivación de la enfermedad a lo largo de su vida, principalmente en los dos años posteriores a la primoinfección. Debido a esto, la identificación de la infección latente y de los individuos con un alto riesgo para desarrollar la enfermedad, que podrían beneficiarse de un tratamiento efectivo, resulta de gran importancia en el control de la tuberculosis. El interés en la latencia micobacteriana ha crecido a lo largo del tiempo debido al fracaso de los fármacos antituberculosos para destruir estos bacilos latentes, considerándose que existe un reservorio natural del bacilo en los pacientes con infección latente.

Una infección por *M. tuberculosis* puede convertirse en latente sin síntomas y puede durar desde pocas semanas a años. El bacilo de la tuberculosis se considera que reside en las lesiones de forma latente hasta que encuentra la oportunidad de reactivarse en el huésped inmunocomprometido, por ejemplo. Esta estrategia no es única de estos bacilos, existen otros microorganismos que adoptan mecanismos parecidos como se ha visto en infecciones por *Helicobacter pylori* o por *Treponema pallidum* (Rhen et al, 2003). En realidad el término de latencia ha sido adoptado de la Virología, aunque la latencia del bacilo tuberculoso no se parezca a la latencia del *virus Herpes simplex*, capaz de integrar su material genético en el interior de huésped. Tampoco *M. tuberculosis* parecía capaz de desarrollar esporas con una enorme capacidad de persistencia como *Bacillus subtilis*, sin embargo, recientemente se ha descrito que varias micobacterias son capaces de esporular, abriéndose por tanto esa posibilidad en el patógeno mayor del género (Ghosh et al, 2009).

Estudios histológicos han demostrado la presencia del bacilo tuberculoso en las lesiones en formas de granulomas (Canetti, 1955). Se han obtenido bacilos de esta localización que han tardado 12 semanas en crecer (Hobby et al, 1954) mientras que otros estudios afirman que bacilos tratados de la misma forma no habían sido capaces de resucitar posteriormente en un medio de cultivo (Wayne, 1960). No está claro si estos bacilos permanecen inactivos por no poder resucitar después o si realmente están muertos.

También se ha llegado a especular con la posibilidad de una localización fuera del macrófago de los bacilos latentes. El grupo de Hernández-Pando lo demuestra usando PCR *in situ* para confirmar la presencia de bacilos en neumocitos de tipo II, células endoteliales y fibroblastos (Hernández-Pando *et al*, 2000). Estos resultados no demostraban si el DNA amplificado pertenecía a un bacilo viable o no. En cambio estudios posteriores han confirmado mediante la retrotranscripción y posterior amplificación, que los bacilos del modelo de Cornell (un modelo de persistencia *in vitro*) tienen actividad metabólica aunque escasa (Pai *et al*, 2000).

7.3. MODELOS DE LATENCIA

Se han propuesto clásicamente diferentes modelos para el estudio de la latencia en *M. tuberculosis*, existiendo modelos *in vivo* e *in vitro*.

Inicialmente se tenía la idea de que el bacilo de la tuberculosis era capaz de permanecer en latencia durante largas temporadas aunque nadie lo había demostrado. La primera confirmación *in vivo* de este fenómeno fue el modelo de Cornell, descrito por McCune y colaboradores en los años 50-60 (McCune *et al*, 1956; McCune *et al*, 1966). Los ratones eran infectados vía intravenosa y se dejaba desarrollar la enfermedad durante dos semanas, momento en el cual se suministraba un tratamiento de isoniazida y pirazinamida durante 3 meses. En aquel momento, los cultivos eran todos negativos. En cambio, pasados otros 3 meses, un tercio de los animales presentaban cultivo positivo para tuberculosis. Por primera vez se había demostrado que el bacilo latente persistía en el tejido y que era refractario al tratamiento, aunque en el cultivo *in vitro* eran susceptibles a los fármacos. Ha habido diferentes variaciones de este modelo variando la vía de infección y las combinaciones de fármacos, y todos pueden demostrar la reactivación de la enfermedad (Scanga *et al*, 1999; Grosset *et al*, 1983; Grosset *et al*, 1992).

Este modelo puede ser criticado porque, en las dos semanas en las que se dejaba desarrollar la enfermedad, el huésped no podía desarrollar una respuesta específica eficiente y una estructura de contención capaz de limitar el crecimiento del bacilo. Además se utilizan antibióticos para inducir latencia, ésta, por tanto, no responde a un fenómeno fisiológico en el que, algunos de los bacilos, entran en estado de latencia al ser fagocitados por los macrófagos que no los reconocen como virulentos, y que se transforman en macrófagos espumosos fagocitando otros productos de necrosis. Otra posibilidad es que los macrófagos destruyan a la mayoría de los bacilos pero un pequeño porcentaje se adapte al estrés y se convierta en latente (Cardona *et al*, 1999).

Otro modelo (Hu *et al*, 2000) desarrollado más recientemente utiliza como mecanismo inductor de latencia altas dosis de rifampicina, somete el cultivo de 100 días a un régimen de 5 días de rifampicina a una concentración de 100 µg/ml. El comportamiento de las micobacterias responde a una población

latente que aumenta la producción de *sigB*, *rpoB*, *hspX*. Este modelo mejora al añadir pirazinamida al régimen de fármacos ya que establece una población homogénea y latente. En este modelo, los bacilos eran viables ya que tenían actividad transcripcional.

Otros investigadores han descrito modelos *in vivo* basados en la aplicación de inóculos mínimos para la infección de los animales de experimentación (Cardona *et al*, 1999).

El paradigma del modelo *in vitro* es el modelo de Wayne (1994). La hipótesis inicial es que el ambiente hostil que hay en los macrófagos, los granulocitos y las lesiones caseosas se debe a la presencia de niveles bajos de oxígeno. Esta hipótesis se ha comprobado recientemente (Dubnau *et al*, 2002) en el estudio con microarrays y otras tecnologías. Este modelo consiste en la restricción gradual de los niveles de oxígeno mimetizando las condiciones *in vivo* durante 10-14 días hasta establecer fases denominadas de persistencia no replicativa (NRP), NRP1 y NRP2. El nivel NRP1 (1% de saturación de Oxígeno) corresponde a condiciones de microaerofilia y está caracterizado por una producción de glicina deshidrogenasa e isocitrato liasa y una generación de ATP mantenida. La segunda fase NRP2 corresponde a condiciones de anaerobiosis (0,06% de saturación de oxígeno) con una caída en picado de la producción de glicina deshidrogenasa por dejar paso a la producción de nitratos. En estos estados de hipoxia no hay síntesis de proteínas aunque los bacilos se mantienen viables (Wayne, 1994; Wayne *et al*, 1996). En un estudio de las condiciones de hipoxia con microarrays se observa que más de 100 genes aumentan su expresión en este modelo: proteína γ -cristalina (*acr*, *hspX*); metabolismo de nitratos (*narX*, *narK2*); metabolismo del hierro (*brfB*); *ctpF* (ATPasa); metabolismo de lípidos (*ahpC*) y otros. En cambio se ve disminuida la transcripción de otros genes, como algunos relacionados con la síntesis de lípidos, proteínas, DNA, aminoácidos, así como del metabolismo aeróbico (Florczyk *et al*, 2003).

Una crítica realizada a este modelo es que la adaptación a las condiciones de hipoxia dura muy poco tiempo y por eso todos los bacilos recuperados van a ser viables dando lugar a 10^8 UFCs/mL. Otro grupo desarrolló una estrategia similar, pero manteniendo la hipoxia durante más tiempo recuperando 10^5 bacilos viables en medio de Sauton (Shleeva *et al*, 2002).

7.4. ESTABLECIMIENTO DE LATENCIA BACTERIANA

Aunque la definición de latencia desde el punto de vista clínico es clara, la situación biológica del bacilo, subyacente a dicha situación clínica se conoce poco. El mecanismo exacto por el que se produce esta adaptación no se conoce en su totalidad y son múltiples los estudios que se están llevando a cabo para definir mejor los factores que intervienen en ella, como el estado metabólico en

que se encuentran los bacilos durante el periodo de latencia, los mecanismos genéticos implicados o la localización de los bacilos latentes.

Con el fin de clarificar la situación de los bacilos en latencia, se han definido dos conceptos, distintos aunque relacionados (Zhang, 2004):

- *Persistencia bacteriana*: Recibe este nombre la capacidad de sobrevivir de las bacterias en condiciones adversas, con baja actividad metabólica, que se describió inicialmente por el fenotipo que se desarrolla frente a la presencia de antibacterianos. Las bacterias *persistentes* pueden o no formar colonias en cultivo, creciendo en general cuando el *agente adverso* desaparece.
- *Latencia bacteriana* (en inglés *dormancy*): Es un estado reversible también considerado de actividad metabólica baja, en el que las bacterias permanecen viables, no formando colonias *in vitro*. Se creen necesarios la participación de factores de resucitación para que este proceso revierta.

En la Tuberculosis se considera que los bacilos establecen latencia en el interior del granuloma, por ello se han desarrollado modelos de laboratorio que mimeticen las condiciones que se cree existen en dicho ambiente: hipoxia, pH ácido, baja carga bacteriana. En base a esos modelos, se han descrito una serie de genes que se asocian y participan en cada una de las dos condiciones mencionadas: persistencia y latencia bacterianas (Muttucumaru *et al*, 2004). Las micobacterias, en particular *M. tuberculosis*, poseen genes asociados a latencia y genes asociados a persistencia (<http://www.tuberculist.fr>), aunque su carga genética varía si se compara con *E. coli*, la bacteria-modelo de *fenotipo persistente* (Kussell *et al*, 2005), por lo que se cree que su situación del bacilo tuberculoso durante la infección latente difiere del *fenotipo bacteriano persistente* clásico.

Algunos de los genes que se asocian al estado de latencia (DeMaio *et al*, 1996; McKinney *et al*, 2000; Hu *et al*, 2001) como los que codifican para los factores sigma F, B, o J de la RNA polimerasa del bacilo; o el gen *icl* que codifica para el enzima isocitrato liasa, esencial para el metabolismo de los ácidos grasos a partir del ciclo de Krebs.

El gen *pcaA* también se ha involucrado en la persistencia de los bacilos en ratones. Su función es la modificación de los ácidos micólicos de la pared micobacteriana por la acción de una metil transferasa (Glickman *et al*, 2000). La *gvcB* (glicina deshidrogenasa) estaba presente en el modelo de Wayne, en la fase NRP1 (Lim *et al*, 1999), pero no se ha podido demostrar claramente su acción. El metabolismo anaeróbico de los nitratos (*narX*, *narK2*, *narG*) ha demostrado su utilidad como marcador de persistencia en el modelo de Wayne.

La proteína Acr (también llamada HspX) parecía jugar un papel en la persistencia gracias a su colaboración en la estabilización de estructuras

celulares con bajas condiciones de oxígeno. También el gen *relA* se activa como respuesta a la falta de nutrientes y su mutación no permite sobrevivir al bacilo durante largas temporadas *in vitro* (Primm *et al*, 2000) ni en anaerobiosis. Su control transcripcional demuestra que *relA* juega un papel importante en la persistencia *in vivo* (Dahl *et al*, 2003).

Se ha descrito un regulón de latencia bajo el control del gen *dosR*, *dormancy survival regulator*. Este regulón, compuesto por unos 48 genes, se activa cuando existe falta de oxígeno y se cree que podría actuar como señal de latencia bacilar *in vivo* (Voskuil *et al*, 2004).

La persistencia bacilar en situación de latencia se lleva a cabo en el interior de las células del hospedador, sabiéndose que, en dicha situación, las bacterias utilizan preferentemente ácidos grasos como fuente de carbono en vez de glucosa. Recientemente se ha evidenciado que los lípidos micobacterianos podrían jugar un papel importante en el establecimiento de la infección latente (Garton *et al*, 2008; Peyron *et al*, 2008), habiéndose demostrado que los bacilos tuberculosos son capaces de establecer una infección persistente en adipocitos, acumulando gotas lipídicas en su interior durante dicho proceso (Neyrolles *et al*, 2006). Estos mecanismos son muy poco conocidos y son necesarios más estudios en modelos válidos de latencia para caracterizarlos (Deb *et al*, 2009).

7.5. MECANISMOS DE SALIDA DE LATENCIA BACTERIANA

Una de las perspectivas más interesantes es saber cómo un bacilo latente es capaz de reactivarse. Esta duda se ha intentado resolver a partir del modelo *in vitro* del bacilo latente. El *rpf*, *resuscitation promoting factor*, de *Micrococcus luteus* ha sido capaz de revertir la latencia en cultivos de *M. tuberculosis* y en el modelo de ratón por aerosol. Se han descritos 5 genes parecidos a *rpf* de *M. luteus* en el bacilo tuberculoso que estarían relacionados con el crecimiento del bacilo (Zhu *et al*, 2003).

No parece claro que exista un gen esencial para mantener la viabilidad en ausencia de crecimiento, aunque es necesario desarrollar más trabajos para dilucidar este fenómeno tan complejo (Tufariello *et al*, 2004).

II- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Según estadísticas de la OMS referidas al año 2008, un tercio de la población mundial, esto es, más de 2.000 millones de personas podrían estar infectadas por el agente causal de la Tuberculosis fruto de algún contagio previo ocurrido a lo largo de su vida. Afortunadamente, el sistema de defensas de la especie humana es muy eficaz y consigue controlar el bacilo de Koch la gran mayoría de las veces que se produce el contagio, por lo que una gran parte de las más de 2.000 millones de personas infectadas permanecen sanas, aunque conviviendo con el bacilo en su interior, constituyendo la denominada *Infección latente*.

Los estudios realizados sobre la infección tuberculosa, sugieren que *Mycobacterium tuberculosis* es capaz de alcanzar un estado de latencia no sólo en tejidos pulmonares, sino también en tejidos extrapulmonares, existan o no granulomas. El bacilo latente podría mantener un metabolismo activo lo que podría demostrarse determinando la síntesis de RNA por la bacteria en esas condiciones.

Entender la situación metabólica de *M. tuberculosis* durante la infección latente ayudaría a encontrar marcadores específicos que posibilitarían la detección y el desarrollo de nuevos fármacos para el control de los bacilos durante este proceso infeccioso.

Estos logros podrían revolucionar el control de la tuberculosis mediante la caracterización de su estado más prevalente: la infección latente.

2. OBJETIVOS

EL OBJETIVO PRINCIPAL de este trabajo es **detectar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* metabólicamente activo en muestras de pacientes sin enfermedad tuberculosa demostrada.** Con este fin, se ha aplicado la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real para la detección de RNA bacteriano directamente sobre muestras clínicas. Se ha utilizado esta metodología por su elevada sensibilidad, dado que se espera la presencia de muy baja carga bacilar en las muestras a estudiar y, por ende, bajo nivel de producto a detectar.

LOS OBJETIVOS SECUNDARIOS son:

1. Diseñar un método de detección de *Mycobacterium tuberculosis* latente/persistente en muestras de tejidos pulmonares y extrapulmonares.
2. Determinar el valor de la PCR en tiempo real como técnica de diagnóstico rápido de la infección causada por *Mycobacterium tuberculosis*.
3. Comparar los métodos habituales de diagnóstico de enfermedad tuberculosa (tinción y cultivo) con la técnica de RT-PCR en tiempo real.
4. Comparar la actividad metabólica bacilar entre muestras con cultivo positivo y con cultivo negativo.
5. Establecer la relación entre la clínica y el estado de latencia/persistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en los pacientes.

III- MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. MUESTRAS

Se estudiaron 104 muestras clínicas provenientes de 2 hospitales ubicados en la Comunidad de Madrid: El Hospital Doce de Octubre (HDO) y la Fundación Jiménez Díaz (FJD). Las muestras fueron recogidas entre todas las que se recibían en los laboratorios de Microbiología Clínica de los hospitales mencionados, procedentes de pacientes en los que se solicitaba estudio de una posible infección por micobacterias, preferentemente *M. tuberculosis*.

La siguiente tabla recoge el origen y distribución de las muestras por hospitales y por región anatómica de origen.

TABLA IV. ORIGEN DE LAS MUESTRAS

TIPO	ORIGEN	HDO	FJD	Total
PULMONARES	Espuito	15	5	20
	Bronquial	5	18	23
	Otros	1	1	2
		21	24	45
EXTRAPULMONARES	Adenopatía/médulas óseas	6	3	9
	Líquidos orgánicos	11	7	18
	Pleural	10	2	12
	Sinovial	2	3	5
	Otros	4	11	15
		33	26	59
	TOTAL			104

En las muestras pulmonares hemos agrupado como bronquiales tanto a los lavados como a las biopsias, el grupo de "Otros" pulmonares incluye biopsias traqueales y transbronquiales.

Dentro de las muestras extrapulmonares hemos agrupado las muestras procedentes de adenopatías y de médula ósea. Los líquidos orgánicos corresponden a muestras de orina y de líquido cefalorraquídeo. En los grupos pleural y en las sinovial, se agrupan las biopsias y los líquidos de estos orígenes y, finalmente, el grupo de "Otros" extrapulmonares comprende las muestras procedentes de biopsias de piel (3 de la FJD), del aparato digestivo (2 de HDO,

3 de FJD) y abscesos (3 de la FJD). En este grupo se incluyen una muestra de cada uno de los siguientes orígenes: del seno paranasal (FJD), de malla periumbilical (FJD); 1 biopsia (HDO) y 1 exudado (HDO) ambos de origen desconocido.

1.2. REACTIVOS UTILIZADOS

- DNA de referencia:
 - ❖ Genoma eucariota → DNA de células HeLa
 - ❖ Genoma procariota → DNA de *M. tuberculosis* H37Rv^T (Cepa-tipo).
- DiEtIl PiroCarbonato (DEPC, Sigma)
- Cloruro de Guanidina (ClGu Merck p.a.)
- Glass-beads (GB) 150-212 µm de diámetro (Sigma)
- Ac Na 3 M pH: 5
- Phenol: Cloroformo: Isoamílico (vol:vol 25:24:1)
- Cloroformo: Isoamílico (24:1)
- EtOH 100%
- EtOH 70%
- H₂O_{DEPC}.
- Random hexámeros 0,5 µg/µl (Promega)
- dNTPs 10 mM (Applied Biosystems)
- Buffer retrotranscripción 5x (Promega)
- RNAsin 40 U/µl (Promega)
- DiTioTreitol 0,1 M
- SuperScript III (200U/µl) (Promega)
- MIX PCRtr (LC FastStart DNA Master SYBR-Green, Roche)
- Agarosa ME (SeaKem) (FMC)
- Buffer Löening 10x (Loening, 1969).
- Bromuro de Etidio (Serva)

2. MÉTODOS

2.1. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Todas las soluciones empleadas para el aislamiento de ácidos nucleicos se tratan con Dietilpirocarbonato (DEPC) para inactivar RNasas.

Para la recogida de las muestras clínicas, se suministraron a los laboratorios de Microbiología de los hospitales participantes, tubos eppendorf conteniendo 400 µl de Cloruro de Guanidina (ClGu) y 200 µl de perlas de vidrio (*glass-beads* GB). El ClGu altera el tejido y desnaturaliza las proteínas preservando la integridad de los ácidos nucleicos, particularmente del RNA. Las GB servirán para romper posteriormente el tejido y las bacterias mecánicamente. Los laboratorios de los hospitales participantes, añaden a la mezcla de ClGu y GB una fracción de la muestra que reciben, antes de iniciar el protocolo de diagnóstico. Las muestras en presencia de ClGu se conservan a -70° C hasta su procesamiento.

El procedimiento utilizado se puso a punto en el laboratorio de Micobacterias de la Universidad Autónoma de Madrid.

La lisis celular se realiza aplicando 7 pulsos a máxima velocidad con el aparato Fast-Prep (Bio 101, SAVANT), manteniendo las muestras en hielo 2 minutos entre cada pulso. Este proceso rompe las células (eucariotas y bacterianas) presentes en la muestra por fricción mecánica con las GB, liberando los ácidos nucleicos.

Seguidamente, se recoge el lisado (un volumen aproximado de 500-600 µl) y se mezcla con 0,1 volúmenes de Ac Na 3 M pH: 5.

Se realiza una extracción con 1 volumen de Fenol: Cloroformo: Isoamílico a pH: 4 (proporción 25:24:1) para eliminar las proteínas. El Fenol está equilibrado a un pH: 4 para favorecer la extracción de RNA, ya que a pH ácido el DNA se permanece preferentemente en la fase orgánica y el RNA en la fase acuosa. La extracción fenólica se realiza mezclando con un vortex durante 30 segundos y manteniendo en hielo 7 minutos. Posteriormente se centrifuga a 13000 rpm durante 5 minutos a 4° C, recogiendo la fase acuosa.

Seguidamente se realiza una segunda extracción con 1 volumen de Cloroformo: Isoamílico (proporción 24:1) para eliminar los restos de fenol, centrifugando de nuevo en las mismas condiciones. La segunda extracción con Cloroformo: Isoamílico se repite 3 veces para purificar mejor la muestra.

Finalmente, se añade al sobrenadante 0,1 volúmenes de Ac Na 3 M a pH: 5 y 3 volúmenes de etanol a 100%. Se incuba a - 70° C toda la noche para precipitar los ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos se recogen por centrifugación a 13000 rpm durante 30 minutos a 4° C. Se elimina el sobrenadante y se lava el precipitado con 500 μ l de etanol al 70% centrifugando a 13000 rpm durante 20 minutos a 4° C. El precipitado se deja secar para eliminar los restos de etanol.

El precipitado se resuspende en 20 μ l de H₂O_{DEPC}. La muestra se mantiene en hielo al menos 1 hora para que se rehidrate y permitir que los ácidos nucleicos se resuspendan.

La muestra de ácidos nucleicos purificados (20 μ l) se divide en 2 alícuotas de 10 μ l cada una. Una de las alícuotas se amplifica directamente por PCRtr para cuantificar el DNA presente. La segunda alícuota se procesa realizando una reacción de retro-transcripción para sintetizar DNA complementario al RNA presente en el producto purificado.

Un esquema del proceso de aislamiento de ácidos nucleicos se muestra en el Gráfico I.

GRÁFICO I

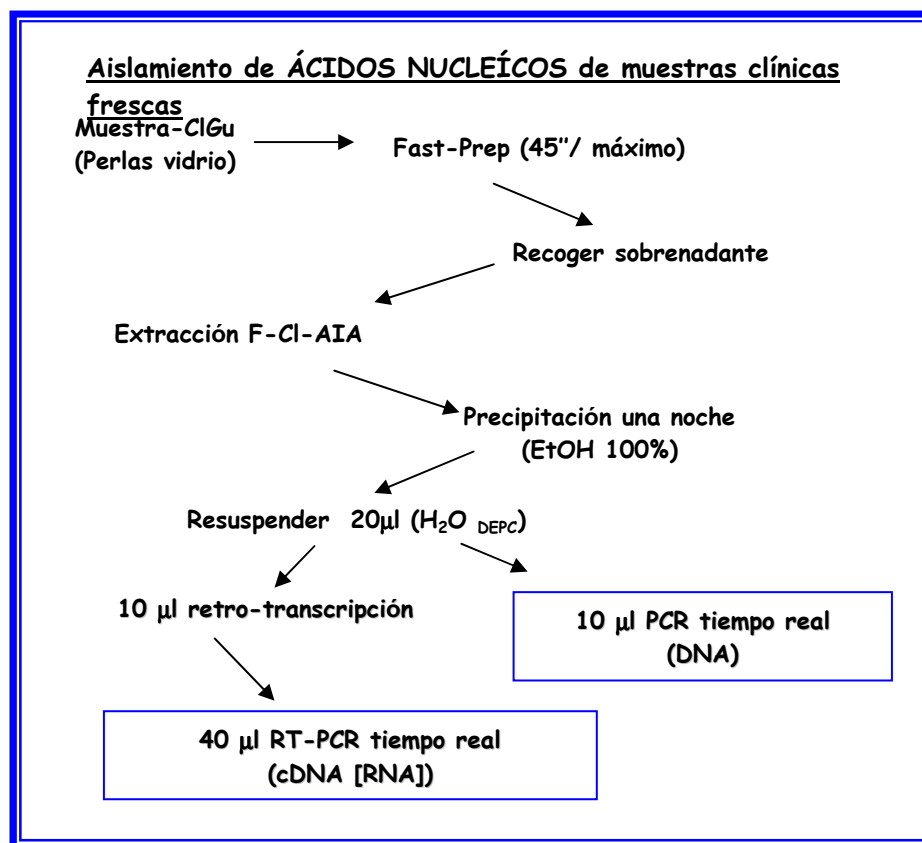


GRÁFICO I: Esquema del procedimiento realizado para la purificación de ácidos nucleicos totales de muestras clínicas. ClGu, Cloruro de Guanidinio; F-Cl-AIA, Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico; EtOH, Etanol; DEPC, Dietil Pirocarbonato.

2.2 RETROTRANSCRIPCIÓN

Como se ha indicado, se obtiene c-DNA a partir de 10 μl de los ácidos nucleicos purificados. En cada reacción se incluye un control negativo, en el que los ácidos nucleicos se sustituyen por 10 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$.

Se prepara la mezcla de reacción 1 (MIX 1) con los siguientes reactivos por muestra: 2 μl de random hexámeros; 2 μl de dNTPs 10 mM (2,5mM cada uno de los cuatro dNTPs) y 12,5 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. Los volúmenes indicados se refieren a una muestra.

Se añaden los 16,5 μl de MIX 1 en los 10 μl de cada muestra y se incuba durante 5 minutos a 65°C para eliminar las estructuras secundarias. Posteriormente se deja un minuto en hielo.

La mezcla de reacción 2 (MIX 2) se prepara mezclando 8 μl de buffer de retrotranscripción (5 veces concentrado), 2 μl de RNAsin 40 U/ μl , 2 μl de DTT 0,1 M y 1,5 μl de retrotranscriptasa (SuperScript III). La transcriptasa inversa SuperScript III es una enzima purificada a partir del genoma del *E. coli* que se usa para sintetizar cDNA a temperaturas superiores a 55°C con gran especificidad, particularmente en ácidos nucleicos con elevado contenido en G+C, como es el caso de *M. tuberculosis*.

Se añaden los 13,5 μl de MIX 2 en cada muestra, dando un volumen final de reacción de 40 μl . Se incuba durante 5 minutos a 25°C y posteriormente a 50°C durante 60 minutos para sintetizar cDNA. Se finaliza la reacción inactivando el enzima durante 15 minutos a 70° C.

2.3. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (PCRtr)

Con el fin de determinar la presencia de *M. tuberculosis* en las muestras clínicas, se puso a punto la cuantificación mediante PCR en tiempo real de diferentes dianas moleculares.

Las determinaciones se realizaron en dos partes:

a) *Detección de DNA*. Se cuantificaron dos dianas: una diana conservada de eucariota (el gen de β -Globina) y una diana específica del complejo *M. tuberculosis* (la secuencia de inserción IS6110). Mediante esta cuantificación se pretende detectar la presencia de DNA eucariota y de DNA procariota en las muestras a analizar.

b) *Detección de RNA.* A partir de los ácidos nucleicos totales aislados de las muestras, se sintetizó cDNA mediante la reacción de retro-transcripción, utilizando cebadores al azar (random hexámeros). Se amplificaron varias dianas de *M. tuberculosis*, según se indica más adelante.

Las reacciones de amplificación se llevan a cabo preparando una mezcla de reactivos (mix) de PCR que contiene por cada muestra: 1 μ l de $MgCl_2$, 1 μ l de SYBR Green (mezclado previamente con L.C. Fast Start que contiene la polimerasa), 0,25 μ l de cada uno de los oligos específicos de la secuencia que vayamos a amplificar, a una concentración de 20 μ M y 4,5 μ l de H_2O .

A continuación se añaden 7 μ l de la Mix a los tubos capilares del Light Cycler, que contienen 3 μ l de muestra.

Los 3 μ l se sustituyen por H_2O en el caso del control negativo y por DNA específico Humano o de la cepa de referencia de *M. tuberculosis*, en los controles positivos.

TABLA V. CONDICIONES APLICADAS para LA PCR en tiempo real

	Nº de ciclos	Tª (°C)	TIEMPO (segundos)	FLUORESCENCIA
Activación del enzima	1	95	600	No
Reacción de amplificación	38 (aprox.)	95	0	No
		*	5	No
		72	10	Puntual

* La temperatura de anillamiento está en dependencia de la diana.

Para poder realizar un análisis comparativo de las diferentes dianas a amplificar se ajustaron las condiciones de amplificación de las diferentes reacciones. De todos los parámetros a tener en cuenta al realizar el experimento, deben considerarse principalmente: La temperatura de anillamiento de las diferentes reacciones que debe ser lo más similar posible; los tamaños de los productos a amplificar que también se recomienda sean similares, considerándose el más idóneo un tamaño alrededor de 100 nucleótidos.

Otros factores a tener en cuenta en las reacciones son:

- La realización de rectas patrón con los DNAs de referencia que se estudien: DNA de células HeLa (referencia para el gen de la β -Globina) y DNA de *M. tuberculosis* H37Rv (para el resto de las dianas).
- La cantidad mínima que puede cuantificarse de forma segura en el sistema Light Cycler empleado es de 100 copias, lo que debe tenerse en cuenta en las rectas patrón a realizar. Solo se evalúan las reacciones con valores de dianas detectados dentro de los rangos de las mencionadas rectas patrón.

TABLA VI. OLIGONUCLEÓTIDOS Y DIANAS UTILIZADAS.

DIANA	SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS	Tª	TAMAÑO DEL AMPLICÓN
Gen de β -Globina	GH20 5'GAAGAGCCAAGGACAGGTAC ³ PCO4 5'CAACTTCATCCACGTTCCACC ³	60°C	268 nt
IS 6110	IS-1 5'CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG ³ IS-2 5'CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG ³	68°C	123 nt
Gen <i>ftsZ</i>	835RL-810FU 5'GCAGCGACTTGGGCTTGTTCC ³ 835RL 5'GGGTGAGCGGCGTCTTGTTAC ³	62°C	71 nt
Gen <i>hspX</i>	268FL-283RU 5'AGCAGAAGGACTTCGACGGTC ³ 268FL 5'GTGCGAACGAAGGAACCGTA ³	64°C	60 nt
Región promotora PCL1	PCL1TB-F 5'TGTGTTTGGTGGTTTCACATT ³ PCL1TB-R 5'GGAAAAGGGAGCCAAAGGTA ³	60°C	120 nt
RNA ribosómico 16S (<i>rrs</i>)	16S-F 5'ATGACGGCCTTCGGGTTGTA ³ RAC-7 5'CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC ³	66°C	120 nt

TABLA VI. Se indica la temperatura utilizada para cada diana en las reacciones de amplificación y el tamaño de los amplicones resultantes.

2.3.1. Características de las dianas que se han amplificado

- **GEN β -GLOBINA:** es un gen de origen humano que codifica para una proteína esencial de las células eucariotas. Se utiliza frecuentemente como control para determinar la integridad del DNA humano en las muestras (Bauer

et al, 1991). Su negatividad puede indicar la presencia de inhibidores de PCR. Su positividad permite descartar falsos negativos.

- **SECUENCIA DE INSERCIÓN IS 6110:** es un elemento transponible y componente específico del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, que se encuentra usualmente repetido a lo largo del cromosoma bacteriano. Esta multiplicidad de la diana favorece una mayor sensibilidad en la detección (Eisenach *et al*, 1990).

- **RNA ribosómico 16S:** Codificado por el gen *rrs*, forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano. Es una secuencia conservada (Tortoli, 2003). Los primers utilizados amplifican una región común a todas las especies del género *Mycobacterium*. El RNA ribosómico constituye el 80% del contenido en RNA de las bacterias, por eso su detección es más probable que la de otros RNAs. Aunque menos estable que el DNA, es más estable que la generalidad de RNAs mensajeros por encontrarse en las células asociado a proteínas formando el ribosoma.

- **Región promotora PCL1:** Es el promotor más activo del operón codificante para RNA ribosómico de *M. tuberculosis* (Gonzalez-y-Merchand *et al*, 1997). Sólo hay una copia de esta diana por genoma bacteriano. La secuencia amplificada es específica de dicha bacteria. Su detección indica que la bacteria está sintetizando RNA ribosomal.

- **GEN *ftsZ*:** Codifica para una proteína implicada en la síntesis del septum bacteriano, un componente esencial para la bacteria durante la división celular (Smith, 2003). Sólo hay una copia del gen por cada genoma. La detección de este mensajero indica que la bacteria esta, potencialmente, dividiéndose activamente.

- **GEN *hspX* (*alpha-crystallin protein*):** Codifica para la proteína bacteriana α -cristalina. Es una proteína de estrés, con función de chaperona, que aumenta cuando la bacteria se encuentra en situaciones de hipoxia, pH ácido o carencia de nutrientes (Smith, 2003). Se cree que participa en el mantenimiento de la viabilidad durante la latencia, infecciones asintomáticas, así como en la replicación durante la infección inicial. Suele considerarse un biomarcador del estado de latencia bacteriano.

2.3.2. Cuantificación de los productos de PCR.

La **cuantificación** se realizó por medio del método de las curvas estándar, que se preparan amplificando mediante PCR con las parejas de iniciadores de cada gen diana en estudio, utilizando diluciones seriadas de DNA de

concentración conocida. Posteriormente se realiza la amplificación de las muestras problema con los iniciadores del gen diana y se calcula la concentración de las muestras problema al extrapolar el dato en su curva estándar correspondiente.

La versión 5.3 del programa del Light Cycler utilizada, permite el almacenamiento de curvas estándar, de manera que pueden importarse a cualquier experimento posterior que se realice amplificando la misma diana (Kühne *et al*, 2002, Rutledge *et al*, 2003). Sólo es necesario amplificar, en cada experimento, una dilución de concentración conocida de la curva estándar junto a las muestras problema. Ésta dilución se utiliza para importar la curva almacenada.

Para la cuantificación se realizaron al menos dos PCRs de cada diana por muestra. En caso de resultados contradictorios entre las dos PCRs, se realizó una tercera.

Los valores obtenidos a partir de las curvas estándar se relacionan con el número de copias (equivalentes de genomas bacterianos) detectados en la muestra. Para el cálculo se considera como referencia el tamaño del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Cuando el valor resultante es menor de 150 copias (se incrementa el límite por seguridad) el resultado se ha considerado negativo.

La detección de IS6110 no se considera cuantificable, dado que es desconocido el número de copias que existan de esta diana en los genomas de *M. tuberculosis* que se estén detectando. Por otro lado, aunque cuantificable, en el gen de β -Globina sólo se ha considerado presencia / ausencia.

2.3.3 Confirmación de la amplificación.

Con el fin de analizar el resultado de la amplificación en más detalle, y para determinar la existencia de posible amplificación inespecífica, se han realizado dos estudios complementarios en las muestras amplificadas: 1) determinación de las curvas de fusión de los amplicones; 2) análisis de las muestras en geles de agarosa.

1) Cuando se utiliza el sistema de detección de fluorescencia con el intercalador de doble hélice SYBR Green, suelen determinarse las curvas de fusión de los productos amplificados, pues este procedimiento permite detectar inespecificidades y confirmar especificidades en la amplificación (ver Introducción apartado 5.3.1.5).

2) Como complemento del estudio de amplificación se han analizado los productos de PCR mediante geles de agarosa para visualizar los amplicones obtenidos. Este experimento ayuda en la interpretación de los resultados obtenidos en la PCR.

Con el fin de analizar los productos de la amplificación mediante electroforesis, se preparan geles de agarosa al 4% dado que se espera un

tamaño de fragmentos pequeño. Se añade a la agarosa Bromuro de Etidio (concentración final de $0.1 \mu\text{g/ml}$) y se corre la electroforesis en Buffer Löening (Loening, 1969) diluido a 1/4x.

Se carga en cada pocillo $5 \mu\text{l}$ del producto de la PCR con $2 \mu\text{l}$ de Azul de Bromofenol utilizando como marcador de tamaños el Ladder 1 Kb Plus DNA ($5 \mu\text{l}$). Se corre la electroforesis a un voltaje, en torno a 50 mV, que no permita subir el amperaje de 100 mA. Finalmente se fotografía el gel visualizando las bandas en un transiluminador con luz ultravioleta.

3. ANÁLISIS DE LAS HISTORIAS CLÍNICAS

En total se estudiaron 104 muestras provenientes de dos hospitales de la Comunidad de Madrid:

- 54 muestras del HDO, que atiende el Área de Salud 11, con casi 7.000 profesionales trabajando en él y 1.300 camas. Fue inaugurado en 1973.
- 50 muestras de la FJD, hospital inaugurado en 1955, fue el primer hospital donde se realizó una prueba para seleccionar a los médicos que querían especializarse, origen del actual sistema MIR. Atiende el Área de Salud 14 de la Comunidad de Madrid.

Se realizó un análisis completo de las historias clínicas de 86 de los pacientes cuyas muestras se estudiaron. De las 54 muestras que procedían del HDO hubo hasta 14 historias clínicas que no pudieron ser estudiadas, debido a diversas causas. En 7 de los casos no fue posible obtener el número de la historia clínica asociada y en otros 2 casos, pese a tener el número de historia, ésta no aportaba más datos que los resultados del estudio de la propia muestra ya que una pertenecía a un paciente que no era de zona y otra pertenecía a un paciente privado. En cinco casos más solo pudo obtenerse el sexo y edad de los pacientes. Por lo tanto, se estudiaron únicamente 40 historias de este hospital. En este hospital, hay una única muestra por paciente.

De las 50 muestras de la FJD, pudimos estudiar todas las historias clínicas, que se encontraban en soporte informático, aunque de una de ellas solo existían los datos de sexo y edad del paciente. En este hospital había 8 muestras que pertenecían al mismo paciente de dos en dos (la muestra 1 pertenece al mismo paciente que la 5, la 2 al mismo paciente que la 15, la muestra 36 al mismo que la 37, y la 38 al mismo que la 40). Por tanto el número total de historias clínicas completas que pudimos valorar de pacientes de este hospital fue de 46.

Se prestó especial atención a los datos pertenecientes al episodio por el cual se tomó la muestra que posteriormente hemos estudiado en este trabajo, pero también teniendo en cuenta episodios previos, principalmente si pudieran estar relacionados con la infección por Tuberculosis, así como los antecedentes personales.

Estudiamos los siguientes datos de cada una de las historias clínicas: fecha de nacimiento; fecha en la que se tomó la muestra y la edad del paciente en el momento de toma de muestra; sexo; nacionalidad y antecedentes personales. De estos últimos se atendió particularmente a aquellos que podían afectar a la infección tuberculosa: valorando si estaban infectados por VIH o si habían tenido contacto con pacientes diagnosticados de TB.

También se revisaron los síntomas y signos que presentaban los pacientes en el momento de acudir al hospital y que ocasionaron la toma de muestra, la

exploración física en el momento del estudio, las pruebas de imagen realizadas si es que se hizo alguna y el resultado del Mantoux.

Respecto a las muestras estudiadas, los laboratorios de Microbiología y de Anatomía Patológica de los dos hospitales nos permitieron utilizar en nuestro estudio los resultados que habían obtenido, microbiológicos e histológicos respectivamente.

Finalmente se estudió cuál había sido el juicio clínico del episodio y el tratamiento realizado. En los casos en los que nos fue posible vimos el seguimiento que se había hecho de los pacientes, los antibiogramas de las muestras con cultivo positivo para *Mycobacterium tuberculosis* y otros datos que pudieran resultar de interés: si el paciente había sido éxitus, si se había fugado, etc.

IV- RESULTADOS

1. MUESTRAS CLÍNICAS

En este estudio se han analizado un total de 104 muestras, 54 del Hospital Doce de Octubre (HDO) y 50 de la Fundación Jiménez Díaz (FJD). De las cuales 45 son pulmonares y 59 extrapulmonares. Estas muestras corresponden a 91 pacientes, 55 varones (tres de los pacientes aportaron dos muestras cada uno) y 36 mujeres (una de las pacientes aportó dos muestras). En nueve de las muestras no se pudo encontrar la filiación.

Las muestras incluidas en este estudio se recogieron en el HDO del 4 de febrero de 2006 al 25 de junio de 2008 y en la FJD del 1 de octubre de 2007 al 18 de junio del 2008.

TABLA VII. RESUMEN DE LAS MUESTRAS SEGÚN ORIGEN

HOSPITALES	M. PULMONARES	M. EXTRAPULMONARES	TOTAL
HDO	21	33	54
FJD	24	26	50
TOTAL	45	59	104

1.1 TIPO DE MUESTRAS

1.1.1 Pulmonares

Dentro de este grupo se han estudiado 45 muestras de los siguientes orígenes: 20 esputos (15 del HDO y 5 de la FJD); 17 lavados bronquiales (1 del HDO y 16 de la FJD); 6 biopsias bronquiales (4 del HDO y 2 de la FJD); una biopsia traqueal (HDO) y una biopsia transbronquial (FJD).

1.1.2 Extrapulmonares

Dentro de este grupo se han estudiado 59 muestras de los siguientes orígenes: 6 adenopatías (todas del HDO); 3 médulas óseas (todas de la FJD); 11 orinas (7 del HDO y 4 de la FJD); 7 líquidos céfalo-raquídeos (4 del HDO y 3 de la FJD); 7 líquidos pleurales (todos del HDO); 5 biopsias pleurales (3 del HDO y 2 de la FJD); 2 líquidos sinoviales (ambos del HDO); 3 biopsias sinoviales (todas de la FJD); 3 biopsias de piel (todas de la FJD); 3 abscesos (todos de la FJD) y 3 biopsias de colon (1 del HDO y 2 de la FJD). Se ha analizado así mismo una biopsia de cada uno de los siguientes orígenes: biopsia gástrica (HDO); biopsia hepática (FJD) y biopsia de seno paranasal (FJD). Finalmente, se estudiaron dos muestras de origen desconocido: 1 exudado (HDO) y 1 biopsia (HDO); así como 1 malla de corrección de hernia (FJD).

Todas las muestras del HDO corresponden a pacientes diferentes, sin embargo hay cuatro pacientes de la FJD en los que se han estudiado dos muestras de cada uno. De origen pulmonar: las muestras 36 y 37 (ambas biopsia bronquial) y las muestras 38 y 40 (ambas esputos) son de un mismo paciente respectivamente. De origen extrapulmonar: las muestras 1 (médula ósea) y 5 (biopsia hepática) son de un mismo paciente. De uno de los pacientes de la FJD se estudiaron dos muestras, una de cada origen: muestra 15 (lavado bronquial) y muestra 2 (médula ósea).

Aunque los resultados de microbiología y anatomía patológica son idénticos en las muestras de un mismo paciente, no lo fueron los resultados de la amplificación, por lo que se han considerado todas estas muestras separadamente en el estudio de amplificación mediante PCR.

1.2 RESULTADOS DE LOS LABORATORIOS CLÍNICOS

Los resultados de los cultivos microbiológicos y los estudios de anatomía patológica se realizaron en los laboratorios correspondientes de los Hospitales 12 de Octubre y Fundación Jiménez Díaz. En las tablas I-A y II-A, del Anexo a los Resultados, se recogen los datos completos de las muestras, cedidos por dichos laboratorios. Como se indica en dichas tablas, en algunos pacientes la muestra estudiada por Anatomía Patológica fue diferente a la que se analizó por Microbiología. El estudio de amplificación realizado en este trabajo lo fue, en todo caso, sobre la muestra recibida en Microbiología.

Del total de 104 muestras analizadas, presentan cultivo positivo 28, de las cuales 23 corresponden al HDO (16 pulmonares y 7 extrapulmonares) y 5 a la FJD (4 pulmonares [correspondientes a 3 pacientes] y 1 extrapulmonar). Asimismo, 75 muestras presentaron cultivo negativo, de éstas, 30 se procesaron en el HDO (5 pulmonares y 25 extrapulmonares) y 45 se procesaron en la FJD (20 pulmonares [correspondientes a 19 pacientes] y 25 extrapulmonares [correspondientes a 23 pacientes]). La muestra número 41 del HDO (de origen extra-pulmonar) tuvo un resultados de contaminación en el cultivo por lo que éste dato no pudo valorarse en dicha muestra. La positividad de los cultivos lo fue siempre para *M. tuberculosis*, siendo también positivos por tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes (Tablas I-A y II-A).

En total se tienen datos de 51 muestras que se analizaron por anatomía patológica: 22 de origen pulmonar y 29 de origen extra-pulmonar. Los datos de anatomía patológica se refieren a muestras tomadas en el mismo período en que se tomaron las muestras analizadas en este trabajo, aunque en algunos casos la localización anatómica difiere.

La mayoría de las muestras procedentes de pacientes con patología pulmonar (Tabla I del Axeno), presentan citología benigna, una de ellas (muestra 17 de la FJD) presenta cambios inespecíficos y en otras dos se identifica

Pneumocystis carinii por histología (muestras 24F y 25F). Una última muestra pulmonar tiene bullas enfisematosas (muestra 13H).

Los resultados de anatomía patológica de las muestras procedentes de pacientes con patología extra-pulmonar son más variados como era de esperar (Tabla II-A del Anexo). Se detectaron lesiones granulomatosas en 2 adenopatías (muestras 6H y 49H) de las 8 muestras que rindieron resultado positivo por cultivo. En las muestras de pacientes cuyo resultado de cultivo en este estudio fue negativo (27) se indica la presencia de citología benigna o inespecífica en 10 casos, en 6 de ellos se observan lesiones inflamatorias de causas diversas y en otros 4 aparecen lesiones neoplásicas o linfomatosas.

1.3 DETECCIÓN DE DNA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

En las tablas VIII y IX que se muestran a continuación se representan los resultados obtenidos tras realizar el análisis mediante PCR en tiempo real de las dianas consideradas para la detección de DNA en las muestras (β -Globina e IS6110).

Se han considerado "no cuantificables" bien porque no se conoce el número exacto de copias por genoma (como es el caso de IS6110) o bien porque se han valorado como presencia-ausencia (como es el caso del gen de la β -Globina). Por esta razón, el resultado de la amplificación se indica como positivo o negativo. En el caso del gen para β -Globina nos permite determinar si la muestra contiene DNA eucariota. En el caso de la diana IS6110, su detección se valora como control previo a la cuantificación de mensajeros, dado que indica la presencia de DNA bacteriano "contaminante".

En el procesamiento llevado a cabo para la preparación de cDNA se evitó el tratamiento con DNasa, para eliminar un paso de purificación suplementario, que conllevaría la disminución en la eficiencia del aislamiento del producto. Por ello, la detección de IS6110 en las muestras permite valorar no sólo la presencia de DNA bacteriano, sino también el nivel de dicho DNA en las mismas.

Con el fin de valorar la presencia de DNA procariota, se ha considerado que el número medio de copias de IS6110 por genoma en *M. tuberculosis* es de diez. Este valor corresponde al valor medio calculado para las cepas españolas, según los datos existentes en las bases de datos de RFLP con esta secuencia de inserción (Universidad de Zaragoza: <http://genmico.unizar.es>). Aplicando ese factor de corrección a las concentraciones detectadas en las muestras positivas para IS6110 (en las tablas referido como "Pos"), y considerando el factor de dilución que se realiza en la síntesis de cDNA (factor 4), se ha calculado la cantidad de DNA bacteriano contaminante. Los valores están indicados en la columna "DNA" de las tablas VIII y IX.

El valor que se indica en la columna "DNA" de las Tablas VIII y IX, se aplica posteriormente, en las muestras correspondientes, como factor de corrección en la cuantificación de las dianas amplificadas a partir de cDNA (ver

apartado 1.4 de Resultados). En algunos casos, la cantidad de DNA presente calculado estaba en niveles no detectables de acuerdo con los criterios indicados en Material y Métodos (apartado 2.3.2) y están referidos en las tablas como "no". Este dato indica que la presencia de DNA bacteriano en las muestras no es valorable.

Las tablas siguientes están organizadas según el origen de las muestras (pulmonares o extrapulmonares) y, dentro de cada grupo, según el hospital de procedencia (HDO y FJD).

TABLA VIII-a. MUESTRAS PULMONARES HDO

<u>Nº</u> <u>Orden</u>	<u>Muestra</u>	<u>Ácidos Nucleicos</u>		
		<u>β-Globina</u>	<u>IS 6110</u>	
				DNA
2	Esputo®	Neg	Neg	
4	Esputo®	Neg	Neg	
5	Esputo®	Neg	Neg	
7	Esputo®	Neg	Neg	
8	Esputo®	Pos	Pos	10 ⁵
9	Esputo®	Pos	Pos	10 ³
10	Esputo®	Neg	Pos	10 ²
11	Esputo®	Neg	Neg	
12	Esputo®	Pos	Pos	10 ²
13	Esputo®	Neg	Neg	
14	Esputo®	Neg	Pos	10
16	Esputo®	Pos	Pos	10 ³
17	Esputo®	Neg	Neg	
18	Esputo®	Neg	Pos	10 ⁵
19	Esputo®	Neg	Neg	
3	BAL®	Neg	Neg	
28	B. Bronquial	Pos	Pos	no
29	B. Bronquial	Neg	Pos	no
39	B. Bronquial	Pos	Neg	
48	B. Bronquial	Pos	Neg	
46	B. Tráquea	Pos	Pos	no

TABLA VIII-b MUESTRAS PULMONARES FJD

<u>N°</u> <u>Orden</u>	<u>Muestra</u>	<u>Ácidos Nucleicos</u>		
		<u>β-Globina</u>	<u>IS 6110</u>	
12	Espuito®	Pos	Neg	DNA
20	Espuito®	Pos	Neg	
38	Espuito®	Neg	Neg	
39	Espuito	Pos	Pos	10 ³
40	Espuito®	Pos	Pos	no
8	BAL	Neg	Neg	no no 10 ⁵ no 10 ² no no
13	BAL	Pos	Neg	
15	BAL	Pos	Neg	
16	BAL	Pos	Neg	
23	BAL	Pos	Neg	
24	BAL	Pos	Neg	
25	BAL	Pos	Pos	
26	BAL	Pos	Pos	
27	BAL	Pos	Pos	
28	BAL	Neg	Neg	
34	BAL	Pos	Neg	
42	BAL	Pos	Pos	
43	BAL	Pos	Pos	
44	BAL	Pos	Pos	
45	BAL	Neg	Neg	
46	BAL	Pos	Pos	
36	B. Bronquial	Pos	Neg	
37	B. Bronquial	Neg	Neg	
17	B. Transbronquial	Pos	Neg	

TABLA VIII: Detección de DNA en muestras pulmonares.

Las muestras se han ordenado según el hospital de origen del que se han obtenido, y están agrupadas en: Espuito (fondo verde); Bronquiales (fondo amarillo) y Otros (fondo naranja). Se indica el resultado positivo (Pos) o negativo (Neg) de la detección. Cuando ambos resultados son negativos se indica en color gris. BAL, lavado broncoalveolar.

En el caso de la diana IS6110 se incluye el factor de corrección que debe aplicarse en la detección del cDNA, debido a la presencia de DNA bacteriano en alguna de las muestras (columna "DNA"). Se especifican aquellas muestras en las que el DNA bacteriano se detecta en niveles no valorables (no). Ver más explicación en el texto.

Las muestras 36 y 37 así como las muestras 38 y 40 (todas de la FJD) son de un mismo paciente. La muestra 15 de la FJD es del mismo paciente que la muestra 2 (Tabla IX-b).

⊙, muestras con resultado de cultivo positivo.

TABLA IX-a. MUESTRAS EXTRAPULMONARES HDO

Nº Orden	Muestra	Ácidos Nucleicos		
		<u>β-Globina</u>	<u>IS 6110</u>	
1	Adenopatía⊙	Pos	Pos	DNA 10 ²
6	Adenopatía⊙	Pos	Pos	no
15	Adenopatía	Pos	Pos	no
49	Adenopatía⊙	Neg	Neg	
50	Adenopatía⊙	Neg	Pos	no
53	Adenopatía	Pos	No dato	
21	Orina	Neg	Pos	no
23	Orina	Neg	Pos	no
24	Orina	Pos	Pos	no
30	Orina	Neg	Neg	
34	Orina	Neg	Neg	
36	Orina	Pos	Pos	no
54	Orina⊙	Neg	Pos	10 ²
32	LCR	Neg	Neg	
33	LCR	Pos	Pos	no
35	LCR	Pos	Pos	no
37	LCR	Neg	Neg	
25	Lq. pleural	Pos	Neg	
26	Lq. pleural	Pos	Pos	no
31	Lq. pleural	Pos	Neg	
38	Lq. pleural⊙	Pos	Pos	10 ²
41	Lq. pleural	Pos	Pos	10 ²
45	Lq. pleural	Pos	Pos	10 ²
47	Lq. pleural	Pos	Neg	
20	B. pleural	Neg	Pos	no
27	B. pleural	Pos	Pos	no
40	B. pleural	Pos	Pos	no
22	Lq. sinovial	Pos	Pos	no
43	Lq. sinovial	Pos	Neg	
42	B. colon	Pos	Pos	no
44	B. gástrica	Pos	Pos	no
51	Biopsia⊙ (*)	Neg	Pos	no
52	Exudado (*)	Neg	Pos	10 ²

TABLA IX-b MUESTRAS EXTRAPULMONARES FJD

N° Orden	Muestra	Ácidos Nucleicos		
		<u>β-Globina</u>	<u>IS 6110</u>	
2	M.O.	Neg	Neg	DNA
5	M.O.	Neg	Neg	
10	M.O.	Neg	Neg	
7	Orina	Neg	Neg	
11	Orina	Pos	Neg	
14	Orina	Neg	Neg	
50	Orina	Neg	Neg	
3	L.C.R.	Neg	Neg	
4	L.C.R.	Neg	Neg	
18	L.C.R.	Pos	Neg	
9	B. Pleural	Neg	Neg	
32	B. Pleural	Neg	Neg	
22	B. Sinovial	Pos	Pos	no
33	B. Sinovial	Pos	Neg	
41	B. Sinovial	Pos	Pos	no
21	B. Piel	Pos	Pos	no
35	B. Piel	Pos	Neg	
47	B. Piel	Pos	Pos	no
6	Absceso	Neg	Neg	
19	Absceso	Pos	Neg	
49	Absceso [©]	Pos	Pos	10 ⁴
31	B. Colon	Pos	Pos	no
48	B. Colon	Pos	Pos	10 ²
1	B. Hepática	Pos	Neg	
29	Malla	Neg	Neg	
30	B. de Seno	Pos	Pos	10 ³

TABLA IX: Detección de DNA en muestras extrapulmonares

Las muestras se han ordenado según el hospital de origen del que se han obtenido, y están agrupadas en: Médula ósea/Adenopatías (fondo naranja); Líquidos (Líquido cefalorraquídeo [L.C.R.] y Orina) (fondo verde); Pleurales (fondo morado); Sinoviales (fondo amarillo) y Otros (Digestivo, piel, origen desconocido) (fondo azul). Se indica el resultado positivo (Pos) o negativo (Neg) de la detección. Cuando ambos resultados son negativos se indica en color gris. Lq, Líquido.

En el caso de la diana IS6110 se incluye el factor de corrección que debe aplicarse en la detección de cDNA, debido a la presencia de DNA bacteriano en alguna de las muestras

(columna "DNA"). Se especifican aquellas muestras en las que el DNA se detecta en niveles no valorables (no).

Ver más explicación en el texto.

Son de un mismo paciente las muestras 1 y 5 de la FJD. La muestra 2 de la FJD es del mismo paciente que la muestra 15 (Tabla VIII-b).

(*), Muestras de origen desconocido. ©, muestras con resultado de cultivo positivo.

Se ha amplificado el gen β -Globina en un total de 62 muestras y la diana IS6110 en 50 muestras, lo que representa el 59,2% y el 47,5% respectivamente. Se ha obtenido un resultado concordante para ambas dianas en 27 de 45 (60%) muestras pulmonares (16 ambas dianas positivas y 11 ambas dianas negativas). A su vez, se ha obtenido resultado concordante en 40 de 59 (68%) muestras extrapulmonares (24 ambas positivas y 16 ambas negativas). Cuando se analizan los resultados discordantes (una diana positiva y otra negativa), lo que se ha encontrado en 32 de las muestras, se obtiene que la situación β -Globina positiva / IS6110 negativa es más frecuente en muestras con cultivo negativo (20/32), siendo la situación contraria (β -Globina negativa / IS6110 positiva) similar comparando las muestras con cultivo positivo y negativo.

1.4 DETECCIÓN DE cDNA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL.

Las tablas siguientes recogen los resultados del análisis de las muestras estudiadas por PCR de aquellos genes y regiones genómicas considerados cuantificables (*ftsZ*, *PCL1*, *16S* y *hspX*) por conocerse el número de copias de cada uno por genoma bacteriano (en todas ellas, una única copia por genoma). El análisis cuantitativo permite determinar la abundancia relativa de los RNAs mensajeros para cada diana, valorado según la cantidad correspondiente de cDNA detectado. De esta manera podremos comparar (teóricamente) el nivel de expresión diferencial en cada muestra.

Los resultados se indican en las tablas. Nuevamente los datos se presentan en orden, clasificadas según el origen de las muestras (pulmonares o extrapulmonares) y según el hospital de procedencia (HDO y FJD).

TABLA X-a. MUESTRAS PULMONARES HDO

N° Orden	Muestra	cDNA			
		<u>16S</u>	<u>PCL1</u>	<u>ftsZ</u>	<u>hspX</u>
2	Esputo®	Neg	Neg	Neg	Neg
4	Esputo®	Neg	Neg	Neg	Neg
5	Esputo®	Neg	Neg	Neg	Neg
7	Esputo®	Neg	Neg	Neg	Neg
8 [#]	Esputo®	No dato	5,11E-02	6,58E+01	1,12E-01
9 [#]	Esputo®	Neg	7,18E-03	2,34E-02	2,59E-01
10 [#]	Esputo®	Neg	Neg	1,87E-01	Neg
11	Esputo®	Neg	Neg	5,54E+01	Neg
12 [#]	Esputo®	Neg	Neg	1,10E-01	Neg
13	Esputo®	Neg	Neg	Neg	Neg
14 [#]	Esputo®	4,23E+01	Neg	Neg	1,47E+02
16 [#]	Esputo®	8,37E-03	3,39E-02	8,22	5,85E-01
17	Esputo®	Neg	Neg	Neg	Neg
18 [#]	Esputo®	7,46	1,37E+01	1,28E-02	Neg
19	Esputo®	Neg	Neg	Neg	Neg
3	BAL®	1,44E+03	Neg	1,55E+03	Neg
28	B. Bronquial	Neg	Neg	Neg	Neg
29	B. Bronquial	Neg	Neg	Neg	Neg
39	B. Bronquial	3,11E+02	Neg	Neg	Neg
48	B. Bronquial	Neg	Neg	Neg	Neg
46	B. Traqueal	Neg	Neg	Neg	Neg

TABLA X-b. MUESTRAS PULMONARES FJD

N° Orden	Muestra	cDNA			
		<u>16S</u>	<u>PCL1</u>	<u>ftsZ</u>	<u>hspX</u>
12	Esputo®	1,51E+03	9,05	Neg	Neg
20	Esputo®	5,53E+03	Neg	5,03	4,14E-01
38	Esputo®	Neg	Neg	Neg	Neg
39 [#]	Esputo	2,81	2,22E-02	Neg	3,12E-02
40	Esputo®	Neg	Neg	Neg	Neg
8	BAL	Neg	Neg	Neg	Neg
13	BAL	Neg	Neg	Neg	Neg
15	BAL	Neg	Neg	Neg	Neg
16	BAL	Neg	Neg	Neg	Neg
23	BAL	Neg	Neg	Neg	Neg
24	BAL	Neg	Neg	Neg	Neg
25	BAL	Neg	Neg	Neg	Neg
26	BAL	1,72E+03	Neg	Neg	Neg

27 [#]	BAL	8,67E-02	Neg	Neg	Neg
28	BAL	Neg	Neg	Neg	Neg
34	BAL	Neg	Neg	Neg	Neg
42	BAL	Neg	Neg	Neg	Neg
43 [#]	BAL	1,97E+01	Neg	Neg	Neg
44	BAL	6,95E+02	Neg	Neg	Neg
45	BAL	Neg	Neg	Neg	Neg
46	BAL	Neg	Neg	Neg	Neg
36	B. Bronquial	Neg	Neg	Neg	Neg
37	B. Bronquial	Neg	Neg	Neg	Neg
17	B. transbronquial	Neg	Neg	Neg	Neg

TABLA X: Detección de cDNA (pg/μl) en muestras pulmonares. El origen de las muestras se identifica por colores según se especificó en la Tabla VIII. BAL, lavado broncoalveolar. Se indican los niveles de cDNA detectados y las muestras con resultado negativo. Cuando todos los resultados han sido negativos se indica en color gris.

[#], Muestras a las que se ha aplicado factor de corrección según Tabla VIII

©, Muestras con resultado de cultivo positivo.

TABLA XI-a. MUESTRAS EXTRAPULMONARES HDO

N° Orden	Muestra	cDNA			
		16S	PCL1	<i>ftsZ</i>	<i>hspX</i>
1 [#]	Adenopatía©	Neg	1,17E+07	8,28E+03	Neg
6	Adenopatía©	7,03E+01	1,72	3,56	Neg
15	Adenopatía	Neg	2,15E+04	5,51	5,01E-01
49	Adenopatía©	7,16E+01	Neg	Neg	Neg
50	Adenopatía©	1,12E+02	Neg	Neg	Neg
53	Adenopatía	Neg	Neg	Neg	Neg
21	Orina	Neg	Neg	Neg	Neg
23	Orina	Neg	Neg	Neg	Neg
24	Orina	Neg	Neg	Neg	Neg
30	Orina	Neg	Neg	Neg	Neg
34	Orina	5,64E+02	Neg	Neg	Neg
36	Orina	2,42E+02	Neg	Neg	Neg
54 [#]	Orina©	1,15	2,24E-03	Neg	Neg
32	L.C.R.	Neg	Neg	Neg	Neg
33	L.C.R.	2,02E+02	Neg	Neg	Neg
35	L.C.R.	Neg	Neg	Neg	Neg
37	L.C.R.	Neg	Neg	Neg	Neg

25	Lq. Pleural	Neg	Neg	Neg	Neg
26	Lq. Pleural	Neg	Neg	Neg	Neg
31	Lq. Pleural	Neg	Neg	Neg	Neg
38 [#]	Lq. Pleural [⊙]	Neg	8,20E+04	5,06E+05	6,66E+01
41 [#]	Lq. Pleural	1,06	Neg	Neg	Neg
45	Lq. Pleural	Neg	Neg	Neg	Neg
47	Lq. Pleural	Neg	Neg	Neg	Neg
20	B. Pleural	Neg	Neg	Neg	Neg
27	B. Pleural	Neg	Neg	Neg	Neg
40	B. Pleural	Neg	Neg	Neg	Neg
22	Lq. Sinovial	Neg	Neg	Neg	Neg
43	Lq. Sinovial	Neg	Neg	3,42E+03	Neg
42	B. Colon	Neg	Neg	Neg	Neg
44	B. Gástrica	Neg	Neg	Neg	Neg
51	Biopsia (*) [⊙]	Neg	Neg	Neg	Neg
52 [#]	Exudado (*)	2,09	Neg	Neg	Neg

TABLA XI-b. MUESTRAS EXTRAPULMONARES FJD

Nº Orden	Muestra	cDNA			
		16S	PCL1	ftsZ	hspX
2	M.O.	Neg	Neg	Neg	Neg
5	M.O.	Neg	Neg	Neg	Neg
10	M.O.	Neg	Neg	Neg	Neg
7	Orina	Neg	Neg	Neg	Neg
11	Orina	1,90E+01	1,27E+01	Neg	Neg
14	Orina	Neg	Neg	Neg	Neg
50	Orina	Neg	Neg	Neg	Neg
3	L.C.R.	Neg	Neg	Neg	Neg
4	L.C.R.	Neg	Neg	Neg	Neg
18	L.C.R.	Neg	Neg	Neg	Neg
9	B. Pleural	Neg	Neg	Neg	Neg
32	B. Pleural	Neg	Neg	Neg	Neg
22	B. Sinovial	Neg	Neg	Neg	Neg
33	B. Sinovial	1,10E+03	Neg	Neg	Neg
41	B. Sinovial	6,28E+02	Neg	Neg	Neg
21	B. Piel	7,65E+02	Neg	1,85	Neg
35	B. Piel	Neg	Neg	Neg	Neg
47	B. Piel	5,74E+02	Neg	Neg	Neg
6	Absceso	4,33E+02	Neg	Neg	Neg

19	Absceso	Neg	Neg	Neg	Neg
49 [#]	Absceso [©]	8,43E-01	6,28E-02	Neg	1,16E-02
31	B. Colon	Neg	Neg	Neg	Neg
48 [#]	B. Colon	6,03E+01	Neg	Neg	2,24E-01
1	B. Hepática	2,62E+02	Neg	Neg	4,73E+01
29	Malla	1,39E+03	Neg	Neg	Neg
30	B. de Seno	Neg	1,79E-01	Neg	Neg

TABLA XI: Detección de cDNA (pg/μl) en muestras extrapulmonares. El origen de las muestras se identifica por colores según se especificó en la Tabla IX. Lq, líquido. Se indican los niveles de cDNA detectados y las muestras con resultado negativo. Cuando todos los resultados son negativos se indica en color gris.

[#], Muestras a las que se ha aplicado factor de corrección según Tabla IX.

[©], Muestras con resultado de cultivo positivo.

(*), Muestras de origen desconocido.

En muestras pulmonares (Tabla X) la diana que se detecta en el mayor número de casos es el rRNA 16S (12/45 muestras), siendo PCL1 y *hspX* las menos frecuentemente amplificadas (6 muestras cada diana). Los niveles de detección en estas muestras están en el rango de 10^{-3} a 10^3 , con valores en general más elevados en muestras con cultivo positivo. Se detecta cDNA de algún tipo en 17 de las 45 muestras pulmonares analizadas (37,8%). Separando las muestras por resultado de cultivo, se detecta cDNA en 11 de las 20 muestras que tuvieron cultivo positivo (55%) y en 6 de 25 con cultivo negativo (24%).

En las muestras extrapulmonares (Tabla XI) también es la diana rRNA 16S la que se amplifica con más frecuencia (18/59 muestras), estando de nuevo la diana *hspX* entre las mas infrecuentes (5 muestras). Los niveles de detección están en el rango entre 10^{-2} y 10^4 (con las excepciones antes mencionadas). Se detecta cDNA de algún tipo en 23 de las 59 muestras analizadas (39%). De nuevo, separando las muestras según el resultado del cultivo, se detecta cDNA en 7 de las 8 muestras que dieron un cultivo positivo (87,5%) y en 15 de las 50 muestras con cultivo negativo (30%). Una de las muestras extrapulmonares del HDO dio cultivo contaminado (Tabla XIa, muestra 41H) y no se ha considerado en este cálculo.

Los niveles de detección de las diferentes dianas suelen ser bajos. La diana del operón de RNA ribosomal PCL1 sin embargo, en una muestra extrapulmonar cultivo positivo se amplifica en el nivel más alto (muestra 1H: 10^7 pg/μl). La diana *hspX* es la que se detecta más escasamente y con valores menores, no superando los 10^2 pg/μl en una muestra cultivo positivo (Tablas X y XI). La diana *ftsZ* es la segunda que se detecta en frecuencia (en un total de 17 muestras) particularmente en muestras con cultivo positivo, en este tipo de

muestras se detecta más frecuentemente que el rRNA 16S (13 y 11 casos respectivamente). Los niveles detectados de esta diana han llegado hasta 10⁵ pg/μl en una muestra extrapulmonar cultivo positivo (muestra 38H, Tabla XI).

Como era de esperar, todas las dianas se detectan, en general, con más frecuencia y en niveles más elevados en muestras con cultivo positivo

1.5. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE PCR EN TIEMPO REAL.

A continuación se resumen todos los resultados positivos, separando de nuevo las muestras por origen: pulmonar y extrapulmonar.

TABLA XII-a. MUESTRAS PULMONARES

Muestras pulmonares	Cultivo +/-	β- Globina	IS6110	16S	PCL1	ftsZ	hspX	Total (cDNA)
Esputo n=20	+ (19)	8	8	5	5	8	5	10*
	- (1)	1	1	1	1		1	1
Bronquial n=23	+ (1)			1		1		1
	- (22)	16	9	5				5
Otros n=2	- (2)	2	1					
Total=45	20/25	27 (60%)	19 (42,2%) / 11 (44%)	12/6	6/1	9/0	6/1	17/ 6 (24%)

TABLA XII-b. MUESTRAS EXTRAPULMONARES

Muestras extrapulmonares	Cultivo +/-	β- Globina	IS6110	16S	PCL1	ftsZ	hspX	Total (cDNA)
Adenopatía / MO n=9	+ (4)	2	3	3	2	2		4*
	- (5)	2	1		1	1	1	1*
Líquidos n=18	+ (1)		1	1	1			1
	- (17)	6	6	4	1			4
Pleural n=11	+ (1)	1	1		1	1	1	1
	- (10)	7	5					
Sinovial n=5	- (5)	5	3	2		1		3*
Otros n=15	+ (2)	1	2	1	1		1	1
	- (13)	10	8	7	1		2	8*
Total=58	8/50	34 (58,6%)	30 (51,7%) / 23 (46%)	18/13	8/3	5/2	5/3	23/ 16 (32%)

TABLA XII: Resultados globales de detección de DNA y cDNA. El origen de las muestras se identifica por colores según se especificó en las Tablas VIII y IX. Se

identifican con color rojo el número de muestras con cultivo negativo, indicándose también en dicho color cuantas han tenido un resultado positivo de amplificación para las dianas bacterianas. Los valores porcentuales están calculados respecto al total (color negro) o únicamente considerando las muestras cultivo negativo (color rojo).

Se han obtenido los siguientes resultados globales para cada una de las dianas analizadas:

a) Detección de DNA

- Gen β -Globina: 61 muestras positivas (27 pulmonares y 34 extrapulmonares) lo que representa 59,2%.
- IS6110: 49 muestras positivas (19 pulmonares y 30 extrapulmonares) lo que representa 47,5%.

b) Detección de cDNA. Se ha detectado cDNA en alguna de las dianas en 40 muestras (17 pulmonares y 23 extrapulmonares) lo que representa 38,8%. Los resultados para cada una de las dianas son los siguientes:

- rRNA 16S: 30 muestras positivas (12 pulmonares y 18 extrapulmonares) lo que representa 29,1%.
- PCL1: 14 muestras positivas (6 pulmonares y 8 extrapulmonares) lo que representa 13,6%.
- *ftsZ*: 14 muestras positivas (9 pulmonares y 5 extrapulmonares) lo que representa 13,6%.
- *hspX*: 11 muestras positivas (6 pulmonares y 5 extrapulmonares) lo que representa 10,7%.

En algunas muestras, identificadas en la tabla con asterisco, no se detectó cDNA de la diana rRNA 16S, sin embargo si se detectó cDNA de alguna de las otras tres dianas analizadas. Este es un resultado inusual, que hemos encontrado en 9 del total de muestras estudiadas (8,6%): seis con cultivo positivo y tres con cultivo negativo.

Se encontraron 17 muestras que, siendo negativas para β -Globina, fueron positivas para alguna diana procariota:

- En 6 muestras se detectó DNA de *M. tuberculosis*: 2 pulmonares (28H y 29H, Tabla VIII-a) y 4 extrapulmonares (20H, 21H, 23H y 51H, Tabla IX-a).
- En 7 muestras se amplificó únicamente alguna diana cDNA: 2 pulmonares (3 y 11 del HDO) y 5 extrapulmonares (34H, 49H y 52H; 6F y 29F) (Tablas X y XI).
- En 4 muestras se amplificaron tanto DNA como cDNA: 2 pulmonares (10H y 14H) y 2 extrapulmonares (50H y 54H) (Tablas X-a y XI-a).

Analizando separadamente las muestras que tuvieron cultivo negativo, se ha detectado DNA de *M. tuberculosis*, mediante la amplificación de IS6110, en el 44% de las muestras pulmonares (11/25) y en el 46% de las extrapulmonares

(23/50). La actividad metabólica de las bacterias, determinada por la presencia de cDNA bacteriano en las muestras, se ha visto respectivamente en el 24% y 32% de las muestras pulmonares y extrapulmonares con cultivo negativo (Tabla XII).

En 25 muestras no ha podido amplificarse ninguna diana, lo que representa el 24% del total en estudio, siendo 7 de ellas cultivo positivo y 17 cultivo negativo (respectivamente 25% y 22,3% del total correspondiente, según el resultado del cultivo: positivo y negativo).

La muestra 41H (extrapulmonar) no se ha incluido en las tablas anteriores debido a que el cultivo resultó contaminado (Tabla IX-a).

2. HISTORIAS CLÍNICAS

Se han revisado las historias clínicas de los pacientes cuyas muestras se habían estudiado. En total se han podido revisar de forma completa 86 historias clínicas, 40 del HDO y 46 de la FJD. En las Tablas III-A a VIII-A del Anexo a los Resultados se resumen los datos de las historias clínicas de los pacientes que se comentan a continuación.

Este apartado se ha organizado primero con una visión general de las historias, analizando los datos según el sexo de los pacientes y la edad. En esta parte se han incluido datos de 91 pacientes, dado que se han podido incluir 5 historias que tenían disponibles únicamente dichos datos. Como recordatorio indicar que los hospitales de procedencia de las muestras se indican con una "H" (HDO [Hospital Doce de Octubre]) o con una "F" (FJD [Fundación Jiménez Díaz]).

2.1 HISTORIAS CLÍNICAS SEGÚN EL SEXO Y LA EDAD DE LOS PACIENTES

2.1.1 Resultados según el sexo

2.1.1.1 Mujeres

El número total de muestras procedentes de mujeres es de 37: 16 del Hospital 12 de Octubre (HDO) y 21 de la Fundación Jiménez Díaz (FJD), dos muestras de la FJD, proceden de la misma paciente (muestras 36F y 37F). Por lo tanto se estudiaron un total de 36 mujeres.

Por nacionalidades, todas las pacientes son españolas excepto una mujer del HDO que procede de Ecuador (de 54 años) y otra de la FJD procedente de Rumania (de 22 años) ambas diagnosticadas de TB.

Consideramos inmunodeprimidos aquellos pacientes con antecedentes de: VIH, trasplante de algún órgano, tumores (tratados con quimioterapia o no), diálisis y pacientes en tratamiento con inmunosupresores. En este sentido hay 5 casos en el HDO (muestras 19H, 22H, 26H, 34H y 40H), de los que 1 tiene diagnóstico de TB (muestra 19H). A este grupo pertenecen también otras 5 pacientes de la FJD (muestras 8F, 11F, 19F, 27F y 47F) de los cuales ninguna fue diagnosticada de TB.

Hay una paciente que padecía VIH, del HDO.

Se indican 5 casos de tabaquismo.

Sólo hay una paciente (muestra 19F), que refiere entre sus antecedentes TB previa (correctamente tratada) que, sin embargo, no tuvo cultivo positivo en la muestra que se le analizó. Tan sólo otra paciente (muestra número 20F) reconoce haber tenido contacto con personas diagnosticadas de TB. El cultivo de su muestra fue positivo.

Se realizaron 8 Mantoux, 5 en el HDO (pacientes de muestras 15H, 34H, 37H, 42H y 44H), y 3 en la FJD (muestras 6F, 14F, y 49F), de los que fue positivo uno en cada hospital (42H en el HDO y 49F en la FJD). La paciente con Mantoux positivo de la FJD tuvo cultivo positivo en la muestra que se le analizó, no así la del HDO.

De las 36 mujeres estudiadas, 4 de ellas fueron diagnosticadas de TB: 2 del HDO (pacientes que corresponden a las muestras 19H: TB Pulmonar y 54H: TB Urinaria) y otras dos de la FJD (pacientes que corresponden a las muestras 20F: TB Pulmonar y 49F: TB Ganglionar). Ninguno de los pacientes falleció.

2.1.1.2 Varones

El número total de muestras procedentes de varones fue de 58: 29 del HDO y 29 de la FJD. Como ya se ha mencionado, hay 3 pacientes de la FJD de los que hay dos muestras para cada uno, por lo que el total de pacientes de la FJD serían 26 y en conjunto habría 55 pacientes varones.

Por nacionalidades, en el HDO hay 9 extranjeros: dos procedentes de Rumanía de 35 y 40 años, dos de Bolivia de 18 y 26 años, uno de Ucrania de 52 años, uno de Bulgaria de 50 años, uno de Nigeria de 41 años, un paciente procedía de Irán de 33 años y otro de Portugal de 66 años. Dos de estos pacientes fueron diagnosticados de TB (pacientes de muestras 18H y 38H). En la FJD hay 3 pacientes procedentes de otros países: Argentina de 33 años (muestra 25F); Perú de 40 años (muestra 43F); y Marruecos de 45 años (del que se han estudiado las muestras 38F y 40F). Este último paciente fue diagnosticado de TB Pulmonar (ambas muestras fueron positivas por cultivo).

Como se ha indicado, consideramos inmunodeprimidos aquellos pacientes con antecedentes de: VIH, trasplante de algún órgano, tumores (tratados con quimioterapia o no), diálisis y pacientes en tratamiento con inmunosupresores. Hemos estudiado 17 varones con algún grado de inmunosupresión: 5 en el HDO; y 12 de la FJD, de los que ninguno tuvo diagnóstico de TB.

Hay 8 pacientes que padecían VIH: 2 del HDO (muestras 30H y 35H); y 6 de la FJD (muestras 2F, 10F, 12F, 15F, 17F, 24F, 25F. Las muestras 2F y 15F son del mismo paciente.

En total se detectaron 29 casos de tabaquismo, de los que 18 fueron del HDO y 11 de la FJD.

Sólo hay un paciente, al que pertenece la muestra número 8H, que refiere entre sus antecedentes TB previa (correctamente tratada) que no tuvo cultivo positivo en esta muestra. En la FJD hubo 2 pacientes con TB previa de los que uno tuvo un tratamiento adecuado (paciente al que pertenece la muestra número 28F) y el otro no (paciente de muestra 10F). Tan sólo un paciente, al que pertenece la muestra 18H, reconoce haber tenido contacto con personas diagnosticadas de TB. El cultivo de su muestra fue positivo.

Se realizaron 14 Mantoux, 10 en pacientes del HDO, de los cuales 2 fueron positivos (muestra 6H, con cultivo positivo; y muestra 31H, con cultivo

negativo). Se detectó un paciente del HDO (muestra 14H), con cultivo positivo y Mantoux negativo. Un paciente no se presentó a leer la prueba. Se realizó la prueba de Mantoux a 4 pacientes de la FJD, de los cuales uno (el paciente al que pertenecían las muestras 38F y 40F) tuvo resultado positivo y fue diagnosticado de TB Pulmonar.

Hasta 10 de los 55 varones estudiados tuvieron diagnóstico de TB: 9 del HDO (correspondientes a las muestras 5H, 6H, 7H, 11H, 13H, 14H, 18H, 38H, 49H) y uno de la FJD (el mencionado de muestras 38F y 40F). Todos los diagnósticos en ambos hospitales fueron de TB Pulmonar. Ninguno de los pacientes falleció.

2.1.2 Resultados según la edad.

GRÁFICO II. Pacientes varones

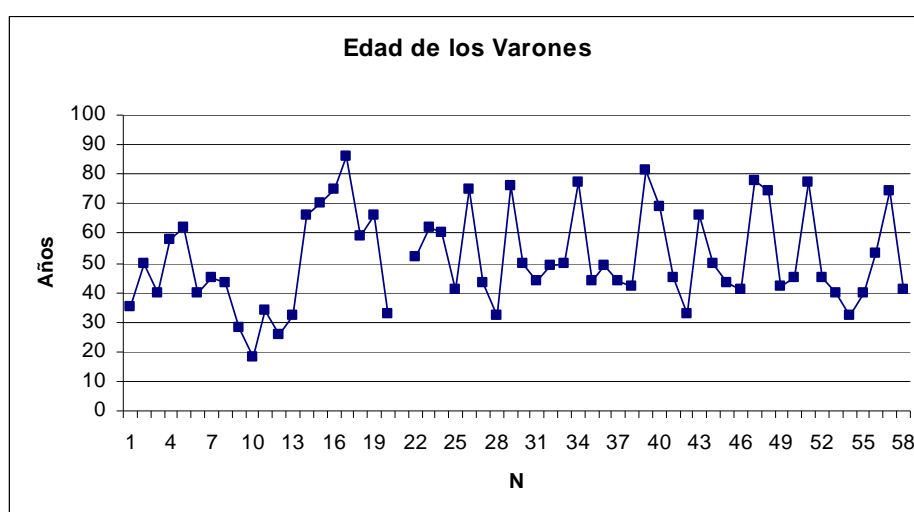
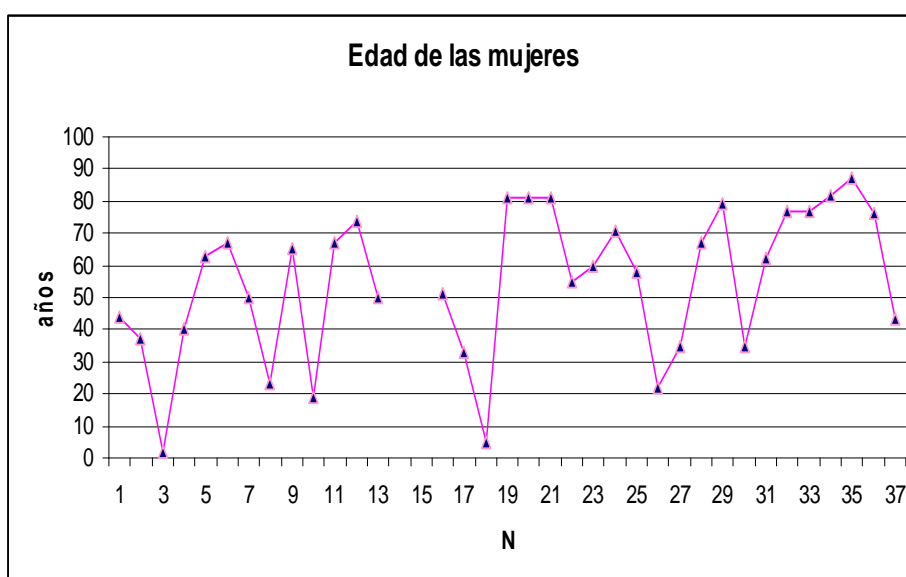


GRÁFICO III. Pacientes mujeres



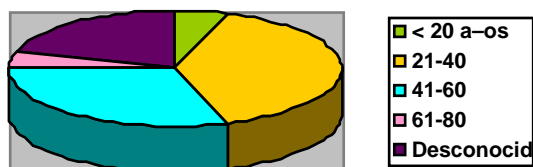
Los gráficos I y II representa la distribución de edades de los pacientes incluidos en el estudio.

GRÁFICO II- Varones. Todos los casos están comprendidos entre los 18 y los 86 años, correspondiendo al HDO la edad más baja 18 años y la más alta 86 años. En la FJD la edad más baja son 32 años y la más alta 81 años. La media de edad es de 51,59 años para el conjunto de los dos hospitales, para el HDO es de 50,25 años y para la FJD es de 53,04 años.

GRÁFICO III- Mujeres. Todos los casos están comprendidos entre los 2 y los 87 años, correspondiendo al HDO la edad más baja 2 años y siendo la más alta en este hospital de 74 años. En la FJD la edad más baja son 5 años y la más alta 87 años. La edad media para las mujeres es de 56, 44 años para los dos hospitales, siendo de 46, 57 años para el HDO y de 63,35 años para la FJD.

GRÁFICO IV. Distribución por edad

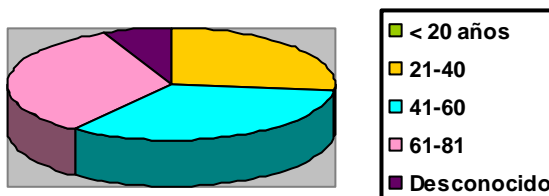
Distribución por edad de pacientes con muestras pulmonares cultivo positivo (n=20).



Distribución por edad de pacientes con muestras pulmonares cultivo negativo (n=6).



Distribución por edad de pacientes con muestras extrapulmonares cultivo positivo (n=8).



Distribución por edad de pacientes con muestras extrapulmonares cultivo negativo (n=16).



En las gráficas anteriores puede observarse una distribución variada de las edades de los pacientes que entraron en el estudio. Únicamente se detecta una ligera mayor frecuencia del rango de edad más avanzada en muestras con cultivo negativo (61-81 años), así como mayor número de pacientes en el rango de edad intermedia (41-60 años).

Seguidamente se verán las historias de los pacientes de acuerdo con el resultado obtenido por PCR. En este apartado solamente se han podido incluir las mencionadas 86 historias.

Este apartado de los Resultados se organizará en dos grupos:

- Pacientes cuyas muestras han dado un resultado negativo para las dianas bacterianas.
- Pacientes cuyas muestras dieron resultado positivo para las dianas de bacterianas

Para una mejor comprensión de los resultados hemos agrupado los pacientes en aquellos en los que el cultivo es positivo y aquellos con cultivo negativo, así como según el origen: muestras pulmonares y extrapulmonares.

2.2 HISTORIAS CLÍNICAS EN RELACIÓN CON EL RESULTADO DE PCR PARA *M. tuberculosis*

2.2.1. Pacientes de muestras con resultado negativo

En total en este grupo se han revisado 34 historias: 13 del HDO y 21 de la FJD, correspondientes a un total de 39 muestras (7 pulmonares y 32 extrapulmonares). En dos pacientes de la FJD se recogieron dos muestras diferentes (muestras 2 y 15 de un paciente y muestras 36 y 37 de otro) que, a pesar de tener diferente origen anatómico, todas ellas dieron resultado negativo para las dianas de *M. tuberculosis*, aunque, para cada paciente, una de las muestras fue negativa para todas las amplificaciones y la otra positiva para β -Globina (ver tablas VIII-b y IX-b).

Se analizan estos resultados en tres bloques:

a) Muestras con cultivo positivo PCR negativa.

Se encontraron 7 muestras, todas de origen pulmonar, que fueron negativas para todas las dianas y que sin embargo tuvieron resultado de cultivo positivo. Por esta razón, se revisaron las historias clínicas de estos pacientes. Un resumen de las historias clínicas de estos 7 pacientes se recoge en la Tabla III-A del Anexo a los Resultados.

En estos pacientes se encuentran 6 eran varones y una mujer. La edad media era 42,3 años. Había dos extranjeros que procedían de Rumanía y Marruecos.

Entre los antecedentes personales el más repetido era el tabaquismo en 6 de los pacientes. La mujer (muestra 19H) era HIV positivo (estadío C3) y había sido diagnosticada de cáncer de cérvix.

La clínica de los siete pacientes era sugerente de Tuberculosis y lo único reseñable es que la duración de los síntomas no es muy prolongada, entre semanas y 4 meses. Presentaban tos o pérdida de peso 5 de los pacientes, fiebre o sudoración nocturna 3 de ellos, y en dos de ellos se indicaba que el paciente tenía hemoptisis.

Hasta 5 de los pacientes tenían una auscultación pulmonar patológica y 6 tenían una radiología de tórax anómala. La anomalía más frecuente en las radiografías son los infiltrados y las cavitaciones, que aparecen en 3 de ellas, otras dos radiografías presentan atelectasias. Los granulomas y el patrón micronodular tan sólo aparecen en una radiografía cada uno.

En todos estos casos las muestras que se estudiaron fueron esputos, que rindieron (como se ha dicho) cultivo positivo para *M. tuberculosis*.

El juicio clínico final fue Tuberculosis Pulmonar. Sólo se recoge el tratamiento administrado a 4 de los pacientes.

b) Muestras con cultivo negativo PCR negativa.

La revisión de las historias clínicas de los pacientes cuyas muestras tuvieron un resultado de cultivo negativo y resultado también negativo por PCR, permitió detectar cinco pacientes cuya clínica era sugerente de infección tuberculosa. Estas historias están resumidas en la Tabla IV-A del Anexo a los Resultados.

c) Muestras con PCR positiva únicamente para β -Globina .

Un total de 15 muestras (14,5%) dieron positiva únicamente la diana β -Globina (8 pulmonares y 7 extrapulmonares) todas ellas fueron cultivo negativo. Todas las muestras pulmonares de este grupo eran de origen bronquial (7 lavados bronquiales y una biopsia), tres de estos pacientes eran VIH positivos. De las muestras extrapulmonares, 3 eran líquidos pleurales. La clínica que

presentaron estos pacientes fue variada, diagnosticándose cuatro procesos neoplásicos y cinco neumonías de etiología diversa. En dos casos los pacientes sufrieron shock séptico. En 7 de los casos hubo éxitus. La tabla V-A del Anexo a los Resultados recoge los datos clínicos de estos pacientes que sugieren infección tuberculosa.

2.2.2 Pacientes de muestras con resultado positivo

Se analizaron un total de 49 muestras de pacientes que resultaron positivas para al menos una de las dianas de *M. tuberculosis* analizadas. Estas muestras correspondían a 25 pacientes del HDO y 24 pacientes de la FJD cuyas historias clínicas se han revisado.

Para analizar esta parte de los resultados, se han dividido estos 49 pacientes en varios apartados. En primer lugar se analizan los pacientes cuyas muestras dieron resultado positivo únicamente para la diana *IS6110*, por lo que solo se detectó DNA de *M. tuberculosis* en sus muestras. Seguidamente, se verán aquellos pacientes en cuyas muestras se detectó mRNA de esta bacteria (mediante amplificación de cDNA).

En cada uno de los apartados, se han organizado de nuevo los resultados según el origen pulmonar o extrapulmonar de las muestras.

2.2.2.1 Pacientes con muestras positivas únicamente para DNA de *M. tuberculosis* (IS6110).

En el grupo con amplificación únicamente de *IS6110* se han encontrado 22 muestras, solo una de ellas tenía cultivo positivo (muestra 40F). El resto de las muestras tenían cultivo negativo. La negatividad del cultivo puede indicar que el DNA detectado sea residual y corresponda a bacterias no viables.

En este grupo se incluyen 7 muestras pulmonares (un esputo y el resto de origen bronquial) y 15 extrapulmonares (de diferentes orígenes anatómicos) (ver Tabla VI-A del Anexo a los Resultados). Las muestras extrapulmonares se componen de tres muestras de orina y cinco de origen pleural como fuentes más frecuentes, siendo también frecuentes las biopsias de diferentes localizaciones.

En total se han revisado 17 historias clínicas: 13 del HDO y 4 de la FJD.

2.2.2.1.1 Muestras pulmonares positivas

Se pudieron revisar cuatro historias clínicas en este grupo de las siete posibles, pues los datos de otros tres pacientes eran escasos o inexistentes. Las historias correspondientes a los cuatro pacientes están resumidas en la Tabla VIa-A del Anexo a los Resultados.

Las muestras son todas de la FJD: 25F, 42F y 46F son lavados bronquiales y la muestra 40F, corresponde a un esputo. De estos pacientes 3 eran varones y uno mujer. Su edad media era 48 años. Había dos extranjeros que procedían de Argentina (25F) y Marruecos (40F, diagnosticado de TB). Entre los

antecedentes personales presentaban tabaquismo 2 de los pacientes. Uno de ellos era HIV positivo (estadío C3) (muestra 25F). Las historias no indican en ninguno de los casos si hubo contacto previo con enfermos de Tuberculosis.

Los tres pacientes cuyas muestras tuvieron resultado de cultivo negativo de este grupo, presentaban clínica débilmente sugerente de infección tuberculosa: tos productiva, febrícula, pérdida de peso y dolor torácico. Dos pacientes presentaban hemoptisis, uno de ellos era el paciente con cultivo positivo (muestra 40F), el otro paciente con hemoptisis y cultivo negativo fue diagnosticado de bronquiolitis infecciosa (muestra 42F). La duración de los síntomas abarcaba entre 2 semanas y 1 año.

Las radiografías de tórax eran patológicas en todos los pacientes, la del paciente diagnosticado de TB presentaba cavitaciones y patrón en vidrio deslustrado, el resto infiltrados, patrón intersticial difuso y opacidad en vidrio deslustrado.

Tan sólo se realizó un Mantoux (en el paciente diagnosticado de TB) que resultó positivo.

El juicio clínico final fue de Neumonía (muestra 25F), Bronquiolitis Infecciosa (muestra 42F) y Fibrosis Pulmonar Idiopática (muestra 46F).

2.2.2.1.2 Muestras extrapulmonares positivas

Todos estos 15 pacientes eran del HDO excepto uno (correspondiente a la muestra 31F). En este grupo se incluye el paciente más joven: una niña de 2 años de edad (20H).

Se pudieron revisar las historias clínicas en 12 de los casos, que se resumen en la Tabla VIb-A del Anexo a los Resultados.

Las muestras son de diferentes orígenes anatómicos (ver Tabla VIb-A del Anexo a los Resultados). De estos pacientes 5 eran varones y 7 mujeres. El grupo incluye un paciente extranjero que procedía de Irán.

Los antecedentes más relevantes son tabaquismo (tres casos), transplante renal en tres casos (muestras 24H, 40H y 31F), enfermedad neoplásica en cuatro casos (muestras 24H, 26H, 27H y 22H), enfermedad de Crohn (muestra 44H) y VIH estadío C3 (muestra 35H).

Los pacientes que presentasen VIH positivo, enfermedad neoplásica, transplante renal, enfermedad de Crohn se consideraron con algún grado de inmunocompromiso debido bien a la enfermedad en sí o bien al tratamiento con quimioterapia o inmunosupresores. En nueve casos se indica la ausencia de contacto previo con pacientes tuberculosos, siendo un caso (42H) mantoux positivo.

La clínica que presentaban los pacientes era bastante variada, por lo que era difícil encontrar en las historias algún patrón común que pueda asociarse o no a enfermedad tuberculosa previa o en curso. Los juicios clínicos también son variados, estando en relación con el cuadro clínico de los pacientes.

2.2.2.2 Pacientes con muestras positivas para cDNA de *M. tuberculosis*.

Se analizan aquí aquellos pacientes cuyas muestras dieron positivas para cDNA de las diferentes dianas estudiadas, tanto si fueron también positivos como negativos para DNA (diana IS6110).

Este grupo de muestras es el más numeroso y por ello se analiza de nuevo separando por origen (pulmonar o extrapulmonar) y por respuesta al cultivo (positivo o negativo).

Las historias clínicas de estos pacientes se resumen en las Tablas VII-A y VIII-A del Anexo a los Resultados. Como recordatorio, los resultados obtenidos para la PCR de este grupo se resumen en tablas al inicio de cada apartado.

2.2.2.2.1 Muestras pulmonares cultivo positivo.

En este grupo hay un total de 11 muestras todas de pacientes diferentes (ver Tabla X de Resultados) sin embargo solo pudieron revisarse las historias de 6 pacientes, 4 del HDO y 2 de la FJD.

TABLA XIII. Muestras pulmonares con cultivo positivo / cDNA positivo

<u>Nº de Orden</u>	<u>Muestra</u>	<u>IS 6110</u>	<u>16S</u>	<u>PCL1</u>	<u>ftsZ</u>	<u>hspX</u>
8 H	Espuito®	Pos		5,11E-02	6,58E+01	1,12E-01
9 [#]	Espuito®	Pos		7,18E-03	2,34E-02	2,59E-01
10 [#]	Espuito®	Pos			1,87E-01	
11 H	Espuito®				5,54E+01	
12 [#]	Espuito®	Pos			1,10E-01	
14 H	Espuito®	Pos	4,23E+01			1,47E+02
16 [#]	Espuito®	Pos	8,37E-03	3,39E-02	8,22	5,85E-01
18 H	Espuito®	Pos	7,46	1,37E+01	1,28E-02	
3	BAL®		1,44E+03		1,55E+03	
12 F	Espuito®		1,51E+03	9,05		
20 F	Espuito®		5,53E+03		5,03	4,14E-01
n=11	TOTAL	7	6	5	9	5

TABLA XIII. Las muestras se identifican según el hospital de procedencia: H, Hospital Doce de Octubre; F, Fundación Jiménez Díaz, y siguiendo la identificación por colores indicada en la Tabla VIII. En color gris se marcan aquellas muestras en las que no pudo revisarse la historia completa de los pacientes de origen.

Resumen de los datos clínicos (Tablas VII-A y VIII-A):

Entre los pacientes de este grupo uno había padecido TB previa correctamente tratada (muestra 8H) y dos de ellos referían haber tenido

contacto con pacientes diagnosticados de TB (muestras 18H y 20F). Uno era VIH positivo.

Al menos dos pacientes referían tos, pérdida de peso o sus síntomas eran de más de dos semanas de duración (11H, 18H y 20F). Tres habían tenido fiebre (11H, 12F y 20F). Un síntoma frecuente fue el dolor torácico.

La auscultación pulmonar estaba descrita como patológica en cuatro pacientes (11H, 18H, 12F y 20F) y en todos ellos se describía una radiografía de tórax también patológica.

El juicio clínico final fue Tuberculosis pulmonar en cuatro casos (muestras 11H, 14H, 18H y 20F). El paciente con muestra 12F fue diagnosticado de EPOC y un último paciente (muestra 8H) de neumotórax traumático. Se realizó tratamiento completo, con curación y sin objetivar efectos secundarios ni complicaciones en las revisiones de cuatro de los pacientes. Uno de ellos se fugó del hospital y no acudió a las revisiones.

En muestras de tres pacientes de este grupo (11H, 12F y 20F) se detecta cDNA sin haberse detectado DNA. El primero de ellos (muestra 12F) es un paciente HIV positivo en estadio tres. El cDNA que se detecta, además del 16S, lo es en todos los casos en niveles bajos, amplificándose la diana *ftsZ* en dos casos. La falta de amplificación de *IS6110* no se explica por las características de los pacientes, pudiendo deberse a problemas inherentes a la técnica.

En la muestra 8 H, no se amplifica 16S pero sí se amplifican otras dianas. Este paciente fue diagnosticado de Neumotórax.

2.2.2.2.2 Muestras extrapulmonares cultivo positivo.

Hay un total de 7 muestras extrapulmonares con cultivo positivo y PCR positiva para cDNA de *M. tuberculosis*, pero únicamente se han podido revisar cinco historias clínicas de los pacientes correspondientes: cuatro del HDO y una de la FJD.

TABLA XIV. Muestras extrapulmonares con cultivo positivo / cDNA positivo

Nº Orden	Muestra	<i>IS 6110</i>	16S	PCL1	<i>ftsZ</i>	<i>hspX</i>
1ª	Adenopatía®	Pos		1,17E+07	8,28E+03	
6 H	Adenopatía®	Pos	7,03E+01	1,72	3,56	
49 H	Adenopatía®		7,16E+01			
50	Adenopatía®	Pos	1,12E+02			
54 H	Orina®	Pos	1,15	2,24E-03		
38 H	Lq. Pleural®	Pos		8,20E+04	5,06E+05	6,66E+01
49 F	Absceso®	Pos	8,43E-01	6,28E-02		1,16E-02
N=7		6	5	5	3	2

TABLA XIV. Las muestras se identifican según el hospital de procedencia: H, Hospital Doce de Octubre; F, Fundación Jiménez Díaz y siguiendo la identificación por colores indicada en la Tabla IX. En color gris se marcan aquellas muestras en las que no pudo revisarse la historia completa de los pacientes de origen.

Resumen de los datos clínicos (Tablas VII-A y VIII-A):

Uno de los pacientes procede de Ecuador, país con alta incidencia de TB.

Ninguno de los pacientes pertenecientes a este grupo había padecido TB anteriormente ni refería haber tenido contacto con pacientes diagnosticados de TB, tampoco referían antecedentes de diabetes mellitus ni de VIH.

La historia clínica era variada, destacando pérdida de peso (54H y 49F), fiebre (34H, 38H y 11F), o presentando síntomas de larga duración (30F).

En dos pacientes se palparon adenopatías cervicales (6H y 49F).

Las radiografías de tórax de los pacientes fueron patológicas en tres de los casos presentando signos diversos.

La prueba del Mantoux fue positiva en dos casos (6H y 49F) y negativa en un tercero (54H). Este último, un paciente procedente de Ecuador, de 51 años de edad, sin antecedentes reseñables que finalmente fue diagnosticado de TB urinaria.

El juicio clínico final fue Tuberculosis de diferentes localizaciones en tres de los casos, no indicándose cual fue el tomado en dos de las historias

En este grupo de pacientes, hay un caso (49 H) en que la muestra fue negativa para IS6110 (DNA de *M. tuberculosis*) y otro (38 H) en el que no se amplificó 16S a pesar de que el resto de las dianas tuvieron resultados positivos. Este último paciente era de origen ucraniano sin domicilio. El resultado de esta última muestra no es explicable, dado que en la historia del paciente se indica la positividad para *M. tuberculosis* de otra muestra de origen pleural no incluida en este estudio. El paciente se diagnosticó de Tuberculosis pleuro-pulmonar.

El paciente 49 H tuvo un diagnóstico de tuberculosis pulmonar con afectación ganglionar.

2.2.2.2.3 Muestras pulmonares cultivo negativo.

De las 25 muestras pulmonares con cultivo negativo por microbiología, 6 tuvieron PCR positiva para mRNA y /o DNA de *M. tuberculosis*. En esta ocasión han podido revisarse todas las historias clínicas de los pacientes correspondientes (uno del HDO y cinco de la FJD).

TABLA XV. Muestras pulmonares con cultivo negativo / cDNA positiva

Nº Orden	Muestra	<i>IS 6110</i>	16S	PCL1	<i>hspX</i>
39 H	B. Bronquial		3,11E+02		
39 F	Esputo	Pos	2,81	2,22E-02	3,12E-02
26 F	BAL	Pos	1,72E+03		
27 F	BAL	Pos	8,67E-02		
43 F	BAL	Pos	1,97E+01		
44 F	BAL	Pos	6,95E+02		
N=6	TOTAL	5	6	1	1

TABLA XV. Las muestras se identifican según el hospital de procedencia: H, Hospital Doce de Octubre; F, Fundación Jiménez Díaz y siguiendo la identificación por colores indicada en la Tabla VIII.

Análisis de los datos clínicos (Tablas VII-A y VIII-A):

Uno de los pacientes de este grupo procede de un país con alta incidencia de TB (muestra 43F).

Ninguno de los pacientes pertenecientes a este grupo había padecido TB anteriormente ni refería haber tenido contacto con pacientes diagnosticados de TB o VIH. Uno de los pacientes estaba con tratamiento inmunosupresor.

Si analizamos la historia clínica de los pacientes de este grupo, ninguno de ellos presentaba sudoración nocturna durante su enfermedad. Aunque dos de los pacientes presentaban tos productiva (39F) o expectoración hemoptoica (43F).

Dos de los pacientes (26F y 39F) tenían una auscultación pulmonar patológica.

Se realizaron radiografías de imagen a todos los pacientes y los resultados fueron siempre patológicos. Los dos pacientes en los que la auscultación había sido patológica presentaban infiltrados parenquimatosos. En la radiografía de al menos uno de los pacientes se observaba: bullas subpleurales (43F) o lesiones residuales con calcificaciones (44F y 39H).

El juicio clínico final de estos pacientes fue: Neumonía neumocócica (39F), Neumonitis aguda intersticial (26F), Insuficiencia respiratoria (39H) y neurofibroma (44F). En los otros dos casos no se consideró como causa del cuadro ninguna patología pulmonar.

Solo una muestra de este grupo (39H) tuvo resultado negativo para DNA de *M. tuberculosis* (diana IS6110), siendo positiva únicamente para la diana rRNA 16S, por lo que no puede descartarse la detección de otras micobacterias. Este paciente presentaba un cuadro de insuficiencia respiratoria con EPOC e

imágenes de calcificación en ambos vértices pulmonares. El paciente estaba en tratamiento con corticoides.

En este grupo de muestras no se ha detectado cDNA de la diana *ftsZ*.

2.2.2.2.4 Muestras extrapulmonares cultivo negativo.

Del total de 51 muestras extrapulmonares con cultivo negativo, 16 tienen PCR positiva, habiéndose podido revisar 14 de las historias clínicas de los pacientes correspondientes.

TABLA XVI. Muestras extrapulmonares cultivo negativo / cDNA positivo

<u>Nº Orden</u>	<u>Muestra</u>	<u>IS 6110</u>	<u>16S</u>	<u>PCL1</u>	<u>ftsZ</u>	<u>hspX</u>
15 H	Adenopatía	Pos		2,15E+04	5,51	5,01E-01
34 H	Orina		5,64E+02			
36	Orina	Pos	2,42E+02			
33 H	L.C.R.	Pos	2,02E+02			
43 H	Lq. Sinovial			3,42E+03		
52	Exudado (*)	Pos				2,09
11 F	Orina		1,90E+01	1,27E+01		
33 F	B. Sinovial		1,10E+03			
41 F	B. Sinovial	Pos	6,28E+02			
21 F	B. Piel	Pos	7,65E+02		1,85	
47 F	B. Piel	Pos	5,74E+02			
6 F	Absceso		4,33E+02			
48 F	B. Colon	Pos	6,03E+01			2,24E-01
1 F*	B. Hepática		2,62E+02			4,73E+01
29 F	Malla		1,39E+03			
30 F	B. de Seno	Pos		1,79E-01		
n=16		9	12	4	2	4

TABLA XVI. Las muestras se identifican según el hospital de procedencia: H, Hospital Doce de Octubre; F, Fundación Jiménez Díaz y siguiendo la identificación por colores indicada en la Tabla IX. *, Una muestra de médula ósea de este paciente fue negativa para todas las dianas (ver apartado 2.3 de resultados). En color gris se marcan aquellas muestras en las que no pudo revisarse la historia completa de los pacientes de origen.

Análisis de los datos clínicos (Tablas VII-A y VIII-A):

Uno de los pacientes perteneciente a este grupo procede de países con alta incidencia de TB (43H).

Solo uno de los pacientes pertenecientes a este grupo refiere antecedentes de tabaquismo (1F), otros dos se encuentran en tratamiento con inmunosupresores, uno de ellos por enfermedad de Crohn (41F) y otro por artritis reumatoide (11F). Uno de los pacientes había tenido un trasplante renal (34H) y otro dos padecían hipertensión arterial (33F) uno de ellos asociada a diabetes mellitus tipo II y mieloma múltiple (47F).

Ninguno de los pacientes refiere antecedentes de TB, contacto con pacientes diagnosticados de TB o VIH.

En general los síntomas referidos eran variados. Hasta en seis casos el ingreso en el hospital se debió a revisiones médicas derivadas de padecimientos previos.

Dos de los pacientes presentaban auscultación pulmonar patológica (11F y 34H).

Se realizaron radiografías de tórax a tres de los pacientes, siendo dos de ellas anodinas y en el otro paciente se observó derrame pleural bilateral (1F).

Se realizó la prueba del Mantoux a cuatro pacientes de los cuales tres fueron negativos (uno de los pacientes estaba en tratamiento con inmunosupresores por trasplante renal). El último paciente no se presentó a su lectura.

El Juicio Clínico final fue variado: Lesiones infecciosas hepáticas en paciente en tratamiento con quimioterapia (1F); Bacteriemia por *E. coli* (34H); Artritis reumatoide (43H); Aplastamiento vertebral traumático con absceso secundario (6F); Sepsis de origen urinario por *E. coli* (11F); Lesión dérmica de etiología sin filiar (21F); Intolerancia a malla de corrección de hernia umbilical (29F); Sinusitis crónica (30F); Recambio prótesis de cadera (33F); Prótesis de cadera Izda (41F); Enfermedad de Crohn (48F) y Pioderma gangrenoso (47F).

En este grupo de muestras no se detectó DNA de *M. tuberculosis* (diana IS6110) en siete de los casos. En cuatro de estos (34H, 6F, 29F y 33F) la única diana amplificada para cDNA fue el rRNA 16S. La clínica de los cuatro pacientes no evidencia un proceso infeccioso claro en dos de los casos, siendo el tercero un absceso secundario a trauma (6F). Como se ha mencionado anteriormente, la detección de otra micobacteria no podría descartarse cuando únicamente se amplifica esta diana en el cDNA, siendo negativa la amplificación de IS6110.

Otros dos pacientes, en cuyas muestras se detecta otra diana además del rRNA 16S, tienen una clínica más sugerente de un posible proceso tuberculoso, con presencia de sintomatología pulmonar, además de la extrapulmonar (1F y 11F). En una de las muestras (43H) solo se amplificó la diana PCL1. El paciente correspondiente tenía un cuadro clínico articular sin indicios de un proceso tuberculoso.

Por último, en dos casos (muestras 15H y 30F) se detectó DNA de *M. tuberculosis* y se amplificaron dianas diferentes de rRNA 16S en el cDNA. La primera de estas historias tiene pocos datos, aunque si indica un resultado de Mantoux negativo. La segunda corresponde a un paciente con un proceso crónico, por lo que no puede descartarse que hubiera recibido tratamiento previo de algún tipo.

La diana *ftsZ* se detectó en niveles bajos y únicamente en dos de las muestras de este grupo (Tabla XVI).



V- DISCUSIÓN

La Tuberculosis se considera una de las enfermedades infecciosas cuya patogenia es más compleja, probablemente debido, entre otras causas, a la larga trayectoria que tiene el bacilo causante de esta enfermedad en compañía del ser humano. Se tienen datos de la misma desde las primeras documentaciones registradas en la humanidad, y ha dejado su sello en muchos aspectos de la actividad humana, incluyendo la música, el arte y la literatura (ver Introducción). Los estudios más recientes sobre el origen de las micobacterias, género al que pertenece el agente causal de la Tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*, indican que aparecieron hace más de 150 millones de años, por lo que un progenitor de *M. tuberculosis* estuvo muy probablemente en contacto y evolucionó junto con los primeros homínidos (Leao & Portaels, 2007).

La patología causada por *M. tuberculosis*, aunque puede afectar a todos los órganos del cuerpo humano tiene el pulmón como órgano-diana preferente, siendo así que la afectación pulmonar constituye la patología tuberculosa mejor conocida y, en general, más fácilmente diagnosticada y tratada (Kritski & Fiuza de Melo, 2007). La afectación de otros órganos es menos frecuente y de más difícil diagnóstico, debido a su sintomatología más inespecífica y a la menor carga bacilar que suelen presentar dichos cuadros (Hopewell, 1994).

Una de las características de esta enfermedad, que se considera dificulta su control, es la existencia de fases silentes de la infección, la denominada *infección latente*. Desde el punto de vista clínico, se define este proceso por la presencia en los pacientes de respuesta inmune frente a antígenos tuberculosos, que indica un contacto previo con el bacilo, sin existir sintomatología ni signos de enfermedad. El diagnóstico de la infección latente ha tenido avances importantes en los últimos años, con la comercialización de procedimientos *in vitro* que mejoran la detección e interpretación de los resultados, aumentando la especificidad respecto a la prueba intradérmica clásica (Ruhwald & Ravn, 2009).

A pesar de los avances en la detección de la infección latente tuberculosa, el conocimiento de la situación de las bacterias en dicho estado aún sigue siendo muy controvertido (Cosma *et al*, 2003). Se acepta que durante este proceso infeccioso, silente desde el punto de vista clínico, las bacterias deben encontrarse en una fase denominada *viable no cultivable*, esto es, no pueden formar colonias en cultivo lo que implica que no puedan ser analizadas por los procedimientos habituales en microbiología.

Se ha aceptado también que las bacterias tuberculosas establecen latencia en el tejido pulmonar, donde pueden detectarse granulomas de larga evolución, que se consideran la localización de dichos bacilos. Sin embargo, desde hace unos años, diversos estudios han demostrado que se puede detectar DNA bacteriano en tejidos no granulomatosos, tanto de origen pulmonar como extra-pulmonares (Neyrolles *et al*, 2006). Trabajos previos realizados en el laboratorio de Micobacterias de la Universidad Autónoma de Madrid, han permitido evidenciar la presencia de DNA de *M. tuberculosis* y de *M. avium* (esta última asociada frecuentemente a infección diseminada en enfermos de SIDA) en tejido extrapulmonar, incluida médula ósea (Rebollo *et al*, enviado a publicación).

En base a estos estudios previos, nos planteamos la presente Tesis, con el ánimo de detectar RNA de *M. tuberculosis* en bacterias viables no cultivables, directamente en muestras clínicas, mediante amplificación por PCR en tiempo real. La detección de dichas moléculas indicaría la presencia de bacilos potencialmente latente pero metabólicamente activos en las muestras.

Con este fin, se recogieron un total de 104 muestras en los laboratorios de Diagnóstico Microbiológico de los Hospitales Doce de Octubre (Dra. Elia Palenque) y Fundación Jiménez Díaz (Dr. Jaime Esteban). La recogida de muestras pretendía no alterar en demasía la rutina diagnóstica de ambos laboratorios, por lo que se seleccionaron muestras extrapulmonares (hasta 59), preferentemente por ser las más escasas, así como un grupo de muestras pulmonares (hasta 45), de todas aquéllas que se iban recibiendo en ambos laboratorios con fines diagnósticos. La selección se hizo con independencia del origen anatómico y desconociendo de inicio el resultado microbiológico de las mismas, así como otros datos clínicos de los pacientes correspondientes. En todos los casos las muestras se enviaron para descartar o confirmar la sospecha de enfermedad micobacteriana.

De todos los pacientes cuyas muestras se estudiaron, en total se pudieron revisar únicamente 91 historias clínicas, aunque de 5 de ellas sólo se indicaban los datos generales de sexo y edad.

El grupo de pacientes analizado constaba de 36 mujeres y 55 hombres, de los que únicamente 14 eran extranjeros, frecuentemente de países con alta incidencia de Tuberculosis. La distribución por edad de los pacientes se muestra en los

gráficos II y III de Resultados, en ellos se observa que el rango de edad es muy amplio siendo más frecuentes los pacientes en edad media-alta (entre 41 y 60 años), estando la edad más alta en 87 años y la más baja en 2 años, correspondiendo a mujeres en ambos casos. Los datos de edad indican que la muestra poblacional en estudio es amplia, no apareciendo sesgada hacia ninguna franja etaria en particular.

Los aspectos generales de la clínica de los pacientes indican que 10 pacientes padecían VIH (9 varones y 1 mujer), detectándose algún grado de inmunocompromiso en hasta 22 pacientes (17 varones y 5 mujeres), finalmente se indica tabaquismo en 34 casos (29 varones y 5 mujeres).

En relación con la Tuberculosis, fueron diagnosticados de esta enfermedad hasta 13 pacientes: 9 varones (3 en muestras extrapulmonares: 6H, 38H, 49H; 6 en muestras pulmonares: 7H, 11H, 13H, 14H, 18H y 38F=40F); y 4 mujeres (2 en muestras extrapulmonares: 54H y 49F y 2 en muestras pulmonares: 19H y 20 F). De estos pacientes, 5 procedían de países endémicos (en muestras extrapulmonares: 38H y 54H; en muestras pulmonares: 18H, 20 F y 38F=40F), las muestras de estos pacientes fueron todas positivas por cultivo. Se han estudiado muestras de 4 pacientes con TB previa (muestras 8H, 10F, 19F y 28F), todos menos uno tratados correctamente.

Respecto al dato de la reacción de Mantoux, se indica su realización en 22 casos, siendo positiva en 5 de ellos (muestras 6H, 27H, 38H, 38F=40F, 49F), detectándose un caso de reacción negativa en un paciente cuya muestra resultó ser positiva por cultivo (muestra 14H) y cuyo único antecedente personal relevante consistía en neumotórax de repetición. Esta última muestra fue positiva para IS6110, evidenciando la presencia de DNA bacteriano.

1. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE MUESTRAS CLÍNICAS

En el laboratorio de Micobacterias de la Universidad Autónoma de Madrid, se puso a punto un método de aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas para este estudio. El método a desarrollar partía de una alícuota de la muestra (aproximadamente 400µl) congelada a -70° en Cloruro de Guanidinio (agente preservante de RNA); después de una fase de lisis mecánica en presencia de perlas de vidrio, se purificaban los ácidos nucleicos con fenol y cloroformo (ver material y Métodos, apartado 2.1). El método se desarrolló minimizando los pasos de purificación, particularmente se evita la digestión con DNasa para eliminar procesos de purificación posteriores que disminuyan la eficiencia en la obtención de ácidos nucleicos. Por esta causa, en el aislamiento se recogen tanto RNA como DNA de origen eucariota y procariota. Se realiza una primera amplificación de la muestra directamente para evaluar la presencia de DNA, seguida de una reacción

de retro-transcripción y posterior amplificación (tanto de DNA como de cDNA) para evaluar la presencia de RNA.

Con el fin de tener información sobre la situación de la bacteria que se detectase en las muestras, se seleccionaron las siguientes dianas para su amplificación (ver apartado 2.3.1 de Materiales y Métodos) :

Detección de DNA:

- Gen β -Globina. Indica la presencia de DNA eucariota en la muestra.
- IS6110. Frecuentemente en multicopia en el genoma, indica la presencia de DNA de bacterias del complejo *M. tuberculosis*.

Detección de RNA:

- RNA ribosomal 16S. Indica la presencia de micobacterias. Se ha elegido esta diana por ser la más abundante en la célula bacteriana.
- RNA mensajero:
 - Promotor PCL1. Su presencia indica que la bacteria está sintetizando activamente dicho RNA.
 - Gen *ftsZ*. Indica que la bacteria está en proceso de división.
 - Gen *hspX*. Indica que la bacteria está respondiendo a situaciones de stress.

Aplicando este procedimiento, se obtuvieron resultados negativos en 25 muestras (24% de todas las analizadas).

En 8 de estos casos con resultado negativo (correspondientes a 7 pacientes), el cultivo resultó positivo (6,7% del total). En las historias clínicas se indica que dos de estos 7 pacientes presentaron hemoptisis (Tabla III-A del anexo a los Resultados), lo que podría explicar el resultado negativo encontrado dado que se sabe que las muestras hemáticas (médula ósea por ejemplo) presentan inhibidores de la PCR. En los otros cinco casos (4,8%) la revisión de las historias clínicas indicaba que podemos estar en presencia de resultados falsamente negativos, al menos en la detección de las dianas bacterianas.

Revisando las historias clínicas de los pacientes cuyas muestras resultaron PCR negativas, teniendo también cultivo negativo (17 muestras- 16,4% del total) los resultados de los análisis diagnósticos realizados, incluido el estudio anatómo-patológico, y el juicio clínico resultante indican que 12 de ellas eran claramente negativas para patologías causadas por micobacterias, teniendo las cinco restantes algún dato sugerente de infección por micobacterias: 3 de los pacientes eran HIV+ en estadio C3 y los 2 restantes tenían patología pulmonar de base (Tabla IV-A del Anexo a los Resultados). Puede, por tanto, considerarse posiblemente verdaderos negativos, los resultados de la PCR de al menos 12 de las muestras analizadas (representando el 11,5% del total).

Los resultados anteriores indican una posible falsa negatividad de la PCR realizada en al menos 8-13 de las muestras en estudio, lo que supone entre el 6,8% y el 12,5% del total. La falsa negatividad puede deberse a problemas en la manipulación, conservación o procesamiento de las muestras, incluida la mínima cantidad de muestra estudiada. No se puede descartar la presencia de inhibidores así como las posibles limitaciones en la eficiencia del método de extracción de ácidos nucleicos utilizado.

2. DETECCIÓN DE DNA EUCARIOTA

La detección de DNA eucariota en las muestras es un procedimiento que se realiza para determinar si las mismas son valorables, pues se considera que la negatividad en dicho componente, junto con la negatividad en la diana diagnóstica, evidencia muestras de mala calidad.

En la Tabla XVII se recoge el resumen de los datos de amplificación por PCR en relación con el resultado para la diana eucariota β -Globina.

TABLA XVII. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

β -Globina	IS 6110 y cDNA -		IS 6110 +		cDNA +		IS 6110 y cDNA +	
POS (n=62)	16		16		7		22	
	C+	C-	C+	C-	C+	C-	C+	C-
	0	16	1	15	2	5	8 (+1)	13
NEG (n=42)	25		5		6		6	
	C+	C-	C+	C-	C+	C-	C+	C-
	8	17	1	4	3	3	3	3
N=104	41		22		13		28	

TABLA XVII. La tabla recoge el resumen de los resultados derivados de la amplificación por PCR en tiempo real, clasificados según el resultado obtenido para la diana eucariota β -Globina. Se indican en las columnas el número de muestras que fueron negativas para todas las dianas bacterianas (IS6110 y cDNA -); y las que fueron positivas para alguna de las dianas, bien sea DNA (IS6110 +), RNA (cDNA +) o ambos (IS6110 y cDNA +). C+, cultivo positivo; C-, cultivo negativo.

Se observa que el resultado de detección de ácidos nucleicos bacterianos es negativo en casi la mitad de las muestras estudiadas (41/104), debe tenerse en cuenta que no se hizo ninguna selección previa de las muestras a analizar. Este

dato indica que, probablemente, la mayoría de las muestras que se envían a los laboratorios de Microbiología para descartar el diagnóstico de Tuberculosis (como principal micobacteriosis) podrían ser negativas. El hecho de que hayan amplificado menos muestras para IS 6110 que para β -Globina es lógico ya que es de esperar más DNA eucariota que de *M. tuberculosis* complex en el contenido de las muestras.

Seguidamente se comentan aquellas muestras que siendo positivas para β -Globina fueron negativas para el resto de las dianas bacterianas. Los resultados positivos para las dianas bacterianas se analizarán en los apartados siguientes.

En el estudio realizado, se ha encontrado resultado β -Globina positiva sin amplificación de dianas bacterianas en 16 muestras (15,5%): 9 pulmonares y 7 extrapulmonares. Todas ellas fueron cultivo negativo lo que indica que probablemente son verdaderos negativos para *M. tuberculosis* por PCR. Se pudieron revisar las historias clínicas de 14 de estos pacientes. Según los datos de estas historias clínicas, 7 de los pacientes son negativos verdaderos para infección por micobacterias, de acuerdo con los resultados de las pruebas diagnósticas realizadas y el juicio clínico resultante. En los otros 7 casos el juicio diagnóstico, aunque no fue tuberculosis ni infección por otras micobacterias, podría ser dudoso debido a que: 2 de ellos eran HIV positivo en estadio C3 y otro más era adicto a drogas por vía parenteral; en dos casos hay historia previa de Tuberculosis (uno de ellos mantoux positivo); y un último paciente tenía síndrome febril cuya filiación no se aclaró (Tabla V-A del Anexo a los Resultados).

Se ha descrito en la literatura que la amplificación de DNA bacteriano es difícil cuando la relación DNA humano: DNA bacteriano es mayor o igual que 190:1 (Restrepo *et al*, 2006). Por tanto, en nuestro estudio no podemos descartar que este fenómeno ocurra en las muestras que siendo positivas para DNA eucariota sean negativas para dianas procariotas.

Finalmente, en nuestro caso, las 9 muestras pulmonares eran todas de origen bronquial y 3 de las 7 extrapulmonares eran de origen pleural, por lo que el origen de la región anatómica del aparato respiratorio aparece en 11 de las 16 muestras. Que el origen de la muestra pueda influir en el resultado de la PCR es un dato que se acepta como probable.

3. DETECCIÓN DE DNA DE *M. tuberculosis*

Con el fin de detectar la presencia de DNA de *M. tuberculosis* en las muestras se realizó amplificación de la secuencia de inserción IS6110 previamente a realizar la retro-transcripción.

La finalidad de este procedimiento era doble. Por un lado la detección de DNA bacteriano es esperable dado que la muestra no estaba tratada con DNasa, por tanto su presencia informaría del nivel de "contaminación" por DNA que se podría estar detectando al amplificar el cDNA. Por otro lado, se pretendía detectar una diana que estuviera en el mayor número de copias posible en el genoma bacteriano, para minimizar así el efecto de que fuese una diana poco frecuente.

Se eligió la secuencia de inserción *IS6110* por tratarse de un componente que se encuentra frecuentemente en un número elevado de copias por genoma (10 copias como media), siendo rara su ausencia en nuestro medio y poco frecuente su presencia en menos de 5 copias (<http://genmico.unizar.es>). El dato obtenido para esta diana se utilizó para cuantificar de forma aproximada la contaminación del cDNA con DNA según se explicó en Resultados (Apartado 1.3).

La diana *IS6110* se amplificó como única diana bacteriana en 22 muestras (Tabla XVII). Su presencia determina la existencia de DNA de bacterias del complejo Tuberculosis (frecuentemente la propia *M. tuberculosis*) en la muestra, por lo que se ha utilizado en la literatura para el diagnóstico molecular de dicha enfermedad (Tortoli & Palomino, 2007). En nuestro caso, sólo una de las muestras (que únicamente amplifica *IS6110*) corresponde a un paciente cuyo diagnóstico fue Tuberculosis pulmonar (muestra 40F), siendo la única de estas muestra con resultado positivo para el cultivo (Tablas VIII y IX). Este mismo paciente tuvo un resultado positivo para la reacción de Mantoux (Tabla VI-A del Anexo a los Resultados). Dada la negatividad de la amplificación de cDNA en esta muestra, podría especularse que el paciente estuviera en tratamiento (dato que no se indica en la historia) o bien que las reacciones de amplificación con cDNA para la muestra analizada fueron falsamente negativas.

Respecto a las 21 muestras restantes *IS6110* positivas con cultivo negativo, el hecho de que sean positivas solo para DNA bacteriano podría indicar que la detección de esta secuencia en las muestras se deba a una infección tuberculosa previa o silente en los pacientes. Analizando las historias clínicas para valorar estos resultados, encontramos que sólo pudo hacerse en 15 de los casos: 3 de las muestras de origen pulmonar (Tabla VIa-A del Anexo a los Resultados) y 12 de las muestras de origen extrapulmonar (Tabla VIb-A del Anexo a los Resultados).

En el caso de los tres pacientes con patología pulmonar y muestras con cultivo negativo, encontramos que uno de ellos se trata de una mujer de 82 años de nacionalidad Española (46F), que sin tener actualmente patología tuberculosa muy probablemente debido a su edad ha estado en contacto previo con el bacilo. Un segundo paciente es HIV positivo en grado C3 (25F), lo que indica inmunosupresión, y un tercer paciente tiene tabaquismo presentando hemoptisis de larga duración

(42F). Por tanto, todos ellos podrían estar padeciendo infección Tuberculosa en mayor o menor nivel.

Considerando los 12 pacientes con muestras extrapulmonares que rindieron cultivo negativo la situación es más compleja. Excepto un caso de 32 años (muestra 24H) y con la excepción de la paciente más joven del estudio (2 años, muestra 20H), el resto de los pacientes tiene una media de edad de 64 años, lo que posibilita contacto previo con el bacilo tuberculoso. Hasta 6 de estos pacientes había tenido tratamiento con corticoides o algún tipo de inmunosupresión en su historia: 22H, Cáncer de mama; 24H, Carcinoma de Tiroides y transplante renal; 26H, Mieloma; 27H, Carcinoma y Adenocarcinoma; 40H y 31F ambos con transplante renal previo. Uno de los pacientes tuvo un Mantoux positivo (42H). Otro paciente tuvo Enfermedad de Crohn (muestra 44H), que se asocia en ciertos casos a infección por *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Además, un paciente VIH positivo refería tratamiento quimioproláctico antituberculoso con Isoniazida hace unos años (muestra 35H).

Por tanto, hasta 9 de estos 15 pacientes podrían estar en condiciones de padecer o haber padecido una infección clínicamente no evidente por *M. tuberculosis*.

En todos los casos de IS6110 positiva como única diana bacteriana, junto a cultivo negativo, los pacientes no estaban recibiendo tratamiento antibiótico, por lo que este factor no parece ser el causante de que se amplifique únicamente DNA de la bacteria. Finalmente, no debe olvidarse que la vacuna actual frente a la Tuberculosis se trata de una vacuna viva, compuesta por la cepa atenuada *M. bovis* BCG, miembro del complejo *M. tuberculosis* y, por ende, portadora de la secuencia de inserción IS6110. El uso de esta vacuna no es obligatorio en muchos países, habiéndose dejado de administrar de forma reglada hace unos años, sin embargo este dato podría explicar el resultado positivo para IS6110, sobre todo en los pacientes de mayor edad. Desafortunadamente la historia de estos pacientes no indica su estatus en referencia a la vacuna tuberculosa.

4. DETECCIÓN DE cDNA DE *M. tuberculosis*

Para solventar el problema que supone la detección de DNA bacteriano, referente a la dificultad en saber si la bacteria de origen esta viva o no, nos planteamos la detección de RNA mensajero bacteriano, para lo que desarrollamos la técnica de PCR cuantitativa sobre cDNA para varias dianas.

Inicialmente, dado que esperábamos detectar una mínima carga bacteriana en las muestras, se diseñaron oligonucleótidos que pudieran amplificar el RNA ribosomal 16S, componente de la subunidad pequeña de los ribosomas, que por tanto se encuentra en gran cantidad en las células. La presencia de ribosomas (o sus componentes) en una bacteria nos indica que se trata de una célula viva, pero, al ser este componente un complejo de RNA y proteínas, la estabilidad de su RNA es mayor que la que posee cualquier RNA mensajero. Este último RNA solo puede encontrarse asociado a proteínas por un corto tiempo (durante el proceso de traducción). Por tanto, se considera que la detección de RNA ribosomal no necesariamente implica una situación metabólicamente activa por parte de la célula, aunque si implica una viabilidad reciente, en todo caso mayor que la que existiría si se detecta DNA.

A pesar de que nos planteamos conocer si las bacterias no cultivables están o no viables (caso de poder detectarlas), consideramos que la detección de RNA ribosomal podría servir como screening para conocer si la bacteria está viva o no. Aquellas bacterias para las que no se amplifique rRNA 16S muy probablemente tampoco amplificarían RNA mensajero.

Un problema asociado también a la detección de rRNA 16S en el sistema diseñado es que no se pudo hacer un diseño de la región específica de este gen para bacterias del complejo *M. tuberculosis*, por lo que los oligonucleótidos empleados amplifican dicha molécula de cualquier micobacteria. Este hecho debe tenerse en cuenta si se amplifica únicamente rRNA 16S de todas las dianas estudiadas.

4.1 Detección únicamente de cDNA de *M. tuberculosis*.

En primer lugar analizamos las muestras que, amplificando cDNA fueron negativas para DNA (*IS6110* negativas). Este resultado puede deberse a varias causas, como la existencia de problemas de sensibilidad en la reacción de amplificación empleada para *IS6110*. Debe considerarse que la preparación de cDNA supone una amplificación en el número de dianas a detectar que no ocurre en la detección de DNA previa a la retro-transcripción. También es posible que se estén detectando micobacterias carentes de *IS6110*.

La amplificación de cDNA, en muestras con resultado de amplificación de *IS6110* negativo, ocurrió en 13 muestras (12,5% del total), de las cuales 5 eran cultivo positivo (todas *M. tuberculosis*) y 8 cultivo negativo.

Muestras cultivo positivo.

En tres de las muestras cultivo positivo (todas pulmonares) se amplifica otra diana de *M. tuberculosis* además de rRNA 16S (3H, 12F y 20F; ver Tabla X de

Resultados). Se pudo consultar la historia clínica de los pacientes correspondientes en dos de los casos. Las historias de estos dos pacientes indicaban una clínica muy sugerente de Tuberculosis pulmonar, que fue el diagnóstico considerado (las historias clínicas de las muestras 12F y 20 F se recogen en la tabla VIIa-A del Anexo a los Resultados, no se tienen datos de la historia clínica de la muestra 3H).

Otra muestra con cultivo positivo amplificó únicamente rRNA 16S (muestra 49H extrapulmonar, Tabla XI de Resultados) y una última amplificó únicamente *ftsZ* (muestra 11H, pulmonar, Tabla X de Resultados). En estos dos casos, las historias clínicas mostraban un diagnóstico de Tuberculosis, en ambos casos pulmonar [la muestra 49H analizada del paciente, correspondía a una adenopatía de ganglios mediastínicos (Tabla VII-A del Anexo a los Resultados)].

Muestras cultivo negativo.

En tres de las muestras extrapulmonares con cultivo negativo se amplificó alguna otra diana diferente al rRNA 16S (una de ellas, 43H, *ftsZ* como única diana amplificada; Tabla X de Resultados) lo que indica que se detecta mRNA específico de *M. tuberculosis* dado que dichas dianas son específicas de esta bacteria. En los tres casos el resultado es dudoso en base a la clínica de los pacientes (Tabla VIIb-A del Anexo a los Resultados), excepto si consideramos que uno de ellos es de origen Nigeriano (muestra 43H), otro tiene 81 años (muestra 11F), y un tercero (de 50 años, (muestra 1F) refiere en su historia que ha recibido tratamiento quimioterápico lo que implicaría un cierto grado de inmunosupresión previa. En los tres casos una explicación posible al resultado de la PCR podría ser que se están detectando bacterias de *M. tuberculosis* viables no cultivables.

Finalmente, las restantes 5 muestras con cultivo negativo, negativas para IS6110 fueron positivas únicamente para rRNA 16S como diana cDNA. Como se ha comentado, en estos casos podría estar detectando una micobacteria diferente a *M. tuberculosis*. Una de las muestras era pulmonar (39H, biopsia bronquial) siendo extrapulmonares las otras cuatro (Tabla VII-A del Anexo a los Resultados). En dos casos la historia presentaba clínica traumatológica y en el caso de la patología pulmonar el paciente tuvo un Mantoux negativo. La edad de los pacientes estaba en el rango entre 43 y 78 años con una excepción (5 años). En todos estos casos, donde se amplifica únicamente rRNA 16S, no puede descartarse la posibilidad de que se estén detectando micobacterias diferentes a *M. tuberculosis*. No debe olvidarse que otras micobacterias diferentes a *M. tuberculosis* se asocian con frecuencia a patología epidérmica y del sistema músculo-esquelético (Brown-Elliott *et al.* 2002).

En resumen, de las 13 muestras que amplificaron cDNA de *M. tuberculosis* pero tenían un resultado negativo para DNA, cinco de ellas correspondían a bacterias viables (fueron cultivo positivo), amplificándose, en todas excepto en una, dianas específicas de *M. tuberculosis*, como era de esperar en base al

resultado del cultivo. De las 8 muestras con cultivo negativo en las que se amplifica sólo cDNA de micobacterias, en tres de ellas al menos podríamos estar detectando *M. tuberculosis* viables no cultivables, de acuerdo con la clínica de los pacientes, siendo esta detección dudosa en las otras cinco muestras.

4.2 Detección de DNA y cDNA de *M. tuberculosis*

La detección tanto de DNA como de cDNA en la misma muestra, es la situación más esperable por indicar que las reacciones de amplificación estarían funcionando correctamente. En nuestro estudio, la amplificación en la misma muestra de estos dos tipos de moléculas resultó ser el resultado más frecuente, dentro de los resultados positivos para la PCR. Se encontraron 28 muestras (26,9% del total) con dicho resultado, sólo 6 de ellas fueron negativas para DNA eucariota (Tabla XVII). En este grupo se encuentra la muestra cuyo cultivo resultó contaminado (41H). Si exceptuamos dicha muestra, encontramos que 12/27 muestras resultaron ser cultivo positivo y 15/27 cultivo negativo.

Respecto a los resultados de amplificación en las muestras cultivo positivo (12/27), dos muestras amplificaron *ftsZ* como única diana, el resto de muestras amplificaron varias dianas, lo que está de acuerdo con el resultado de cultivo que tuvieron las muestras (Tablas IX y X de Resultados). Pudo hacerse una revisión de las historias clínicas de los pacientes correspondientes en 7 de las estas muestras (Tabla VIII-A del Anexo a los Resultados), 3 de origen pulmonar y 4 extrapulmonar. Excepto en uno de los casos (muestra 8H), paciente rumano con cuadro pulmonar diagnosticado de neumotórax, pero que había padecido Tuberculosis anteriormente, el resto de los pacientes tuvieron un diagnóstico de Tuberculosis que se correspondía también con el cuadro clínico que presentaban: 2 pulmonar (muestras 14H y 18H); 1 pleuro-pulmonar (muestra 38H); 2 ganglionar (muestras 6H y 49F) y una última urinaria (muestra 54H).

En las muestras con cultivo negativo, pudieron revisarse 11 de las historias clínicas de los pacientes correspondientes (Tablas VIII-A del Anexo a los Resultados). En estas muestras, se amplifica una diana diferente a rRNA 16S en 4 de ellas (muestras 15H, 30F, 39F y 48F) lo que significa detectar RNA mensajero específico de *M. tuberculosis* en las mismas. En base a este resultado, las historias clínicas de los pacientes correspondientes son de difícil interpretación. Uno de ellos (muestra 39F) es un paciente de 77 años con un cuadro respiratorio florido de tres días de duración que se diagnosticó como Neumonía neumocócica; los niveles de cDNA de *M. tuberculosis* detectados en su esputo fueron bajos, incluso para el rRNA. Otro paciente (muestra 48F) se diagnosticó de Enfermedad de Crohn, patología que, como se ha mencionado, se asocia a infección por micobacterias en ciertos casos. En este paciente y en los dos restantes la muestra

fue biopsia (seno paranasal, ganglio cervical y colon). Los cuatro pacientes son de origen español. De nuevo, la posible explicación para este resultado es que se esté detectando *M. tuberculosis* viables (están sintetizando mRNA activamente) pero no cultivables.

En los restantes 7 pacientes con muestras con cultivo negativo, que tuvieron PCR positiva para DNA y cDNA bacterianos, únicamente se amplificó la diana rRNA 16S. En este grupo, pudieron revisarse las 7 historias clínicas.

Cuatro de los pacientes tenían patología pulmonar, y se les analizó una muestra de lavado bronquial (muestras 26F, 27F, 43F y 44F) en ninguno de los cuatro casos el diagnóstico se relacionó con patología infecciosa (Tabla VIIIa-A del Anexo a los Resultados). El resultado de PCR obtenido en estos cuatro casos podría indicar que estuviésemos detectando otras micobacterias diferentes a *M. tuberculosis*, probablemente de la microbiota transitoria del tracto respiratorio.

Los otros tres pacientes presentaban cuadros extrapulmonares, siendo las muestras que se analizaron dos biopsias de piel (muestras 21F y 47F) y una biopsia sinovial (muestra 41F); de nuevo, en dos de ellos el cuadro que presentaban no estaba relacionado con patología infecciosa, siendo el tercero diagnosticado de Pioderma Gangrenoso (Tabla VIIIb-A del Anexo a los Resultados).

En todos estos pacientes la posible detección de cDNA procedente de otra micobacteria no puede descartarse, sin embargo no debe olvidarse que, en estas 11 muestras, también se amplificó DNA del complejo *M. tuberculosis*, lo que cuenta a favor de la presencia de esta bacteria (o su DNA) en la muestra.

Finalmente, la muestra cuyo cultivo no pudo ser evaluado, amplificó únicamente rRNA 16S como diana cDNA. A este paciente se le diagnosticó de Endocarditis Bacteriana, pudiendo entrar en el grupo comentado en el párrafo anterior en relación con la detección de cDNA.

En resumen, Los pacientes de las muestras con cultivo positivo tuvieron un resultado de PCR acorde con el cultivo y con el cuadro clínico (excepto en un caso). Por otro lado, de las 15 muestras con cultivo negativo en las que se amplificó tanto DNA como cDNA por PCR en tiempo real, podría haberse detectado *M. tuberculosis* viables no cultivables en 4 de ellas (aquellas en que se detecta una diana diferente a rRNA 16S), siendo esta detección también probable en las 11 restantes dado que también se amplifica la diana IS6110.

5. DETECCIÓN DE *M. tuberculosis* VIABLES NO CULTIVABLES

En la tabla XVIII se resume el número de muestras que con cultivo negativo (lo que significaría bacterias no cultivables) pueden detectarse bacterias mediante PCR por dar amplificación de alguna de las dianas ensayadas.

TABLA XVIII. DETECCIÓN DE BACTERIAS VIABLES NO CULTIVABLES

Muestras cultivo negativo		Solo DNA	cDNA (+ DNA)		Total
		IS6110	Solo rRNA 16S	Cualquier diana	
Pulmonar	Espuito (n=1)			1	1
	Bronquial (n=22)	3-2*	4-1"		7 (3)
	Otros (n=2)	1*			(1)
Extra Pulmonar	Adenopatía / MO (n=5)			1	1
	Líquidos (n=17)	2-1*-1"	2*-1"	1-1*	3 (4)
	Pleural (n=10)	3-2"			3 (2)
	Sinovial (n=5)	1-1*	1-1"	1	3 (2)
	Otros (n=13)	3	2-2"	3-1*	8 (3)
Total	n=75	12 (8)	7 (5)	7 (2)	26 (15)

TABLA XVIII. Muestras cultivo negativo, organizadas según el origen, en las que se ha detectado DNA o cDNA de micobacterias. En color rojo se indican aquellas en las que los datos de las historias clínicas de los pacientes son compatibles con dicho resultado. *, Muestras de pacientes cuyas historias clínicas no pudieron consultarse; ", muestras de pacientes cuyas historias clínicas no sugerían infección por micobacterias. Entre paréntesis se indican aquellas muestras con PCR positiva no confirmada por los datos de las historias clínicas.

De acuerdo con los datos de amplificación de DNA y de cDNA de micobacterias analizados en las muestras, así como de la revisión de las historias clínicas de los pacientes correspondientes, la detección de *M. tuberculosis* viables no cultivables (muestras cultivo negativo) puede considerarse en:

- **14 muestras** (7 con detección de IS6110 y rRNA 16S; 7 con detección de cDNA específico), en este grupo se podrían incluir 5 muestras más de las que no se han podido consultar las historias clínicas de los pacientes. Estos datos representan: 18,7% (14/75) - 25,3% (19/75) de las muestras con cultivo negativo; y 13,5% (14/104) - 18,3% (19/104) del total de muestras estudiadas.

- **12 muestras** en las que se ha detectado DNA del complejo *M. tuberculosis* (IS6110) que indica la presencia de genoma de dichas bacterias en las muestras, en este grupo se podrían incluir 3 muestras más de las que no se pudo consultar la historia clínica de los pacientes. Estos datos representan: 16% (12/75) - 20% (15/75) de las muestras con cultivo negativo); y 11,5% (12/104) - 14,4% (15/104) del total de muestras estudiadas.

Según los datos anteriores, en la población estudiada se ha detectado *M. tuberculosis* en 26 muestras, correspondientes a 95 pacientes, lo que representa el 27,4% de la misma. Este valor está de acuerdo con los datos que se aceptan respecto a la incidencia de la infección latente por *M. tuberculosis*, que se han determinado por la reacción intradérmica de Mantoux (www.who.int/topics/tuberculosis). De este modo, podría sugerirse que, mediante amplificación molecular, pueden detectarse bacterias en estado de latencia. Sólo se detecta actividad metabólica en algo más de la mitad de las mismas, apoyando el estado silente que se supone presentan *in vivo*.

**TABLA XIX. DETECCIÓN DE LAS DIFERENTES DIANAS PARA cDNA
MEDIANTE PCR**

CULTIVO	rRNA 16S	PCL1	<i>ftsZ</i>	<i>hspX</i>	Nº muestras
POSITIVO n=28	10 (35,7%)	10 (35,7%)	12 (42,9%)	7 (25%)	19/28 (67,8%)
NEGATIVO n=75	19 (25,3%)	3 (4%)	3 (4%)	4 (5,3%)	22 /75 (28,9%)
Total= 103	29 (28,2%)	13 (12,6%)	15 (14,5%)	11 (10,7%)	41 (39,8%)

TABLA XIX. Muestras con resultado positivo para cada diana. Se indica el valor porcentual que representa entre paréntesis.

Con el fin de determinar qué tipo de actividad metabólica tiene las bacterias que se han detectado, se resumen los resultados de amplificación obtenidos en la Tabla XIX, comparando con el resultado del cultivo. Se ha eliminado el dato de la muestra 41H porque su cultivo no pudo evaluarse.

Como se ha comentado anteriormente, un resultado esperable que se observa en la amplificación, es su mayor frecuencia en las muestras que rinden cultivo positivo, comparadas con las que fueron cultivo negativo (67,8% *versus* 28,9%) consecuencia del mayor porcentaje resultante en cada una de las dianas.

En la tabla anterior se observa que, tomados los datos globalmente, la diana que más frecuentemente se detecta es el rRNA 16S (28,2%), como era de esperar en relación con su abundancia en las células, sin embargo destaca la abundancia en la detección de la diana *ftsZ* en muestras cultivo positivo (42,9%), también resultado esperable por la función esencial que desarrolla este producto génico en las células en división.

Es interesante el resultado obtenido para la diana *hspX*, pues aunque se trata de la menos frecuente en nuestro estudio es ligeramente superior su detección en muestras con cultivo negativo, comparada con las otras dos dianas de RNA mensajero (PCL1 y *ftsZ*); dado que se ha asociado un incremento en este producto en bacterias en estado de latencia, es tentador sugerir que su detección esté relacionada con bacterias en esa situación. Sin embargo no debe olvidarse que la proteína producto de este gen (α -Cristalina) tiene función de chaperona y está aumentada en muchas situaciones de estrés (Smith, 2003).

Finalmente, en relación con la diana PCL1, que nos está indicando la síntesis activa de RNA ribosomal por la célula, su frecuencia en muestras con cultivo positivo indica que la célula está activamente sintetizando rRNA 16S, prácticamente en el mismo nivel en que se está usando (35,7% en ambos casos). Sin embargo, el resultado obtenido en las muestras con cultivo negativo parece indicar que la célula sintetizaría RNA ribosomal en un nivel mucho menor, similar al nivel en que sintetiza mensajeros importantes para la división celular (se obtiene el mismo resultado que *ftsZ*) y que, por tanto, la mayor parte del RNA ribosomal que se detecta en estas muestras o bien no corresponde a RNA de *M. tuberculosis* (dado que la diana PCL1 diseñada es específica de esta bacteria), o bien corresponde a bacterias que no se dividen, aunque puedan mantener cierta actividad metabólica.



VI- CONCLUSIONES

1. Debido a la complejidad de la clínica de la Tuberculosis, no hemos podido objetivar ningún marcador clínico que nos permita sospechar la presencia de bacilos en situación de latencia, aunque sí hemos detectado bacterias potencialmente en estado de latencia mediante amplificación molecular.
2. Dado que hemos encontrado una posible falsa negatividad de la PCR, en al menos entre 8 y 13 de las muestras estudiadas (equivalente a entre 6,8% y el 12,5% del total) consideramos que el valor de la PCR utilizada en nuestro estudio, como diagnostico rápido de infección por *M. tuberculosis*, es limitado.
3. En nuestro estudio, la amplificación de la diana eucariota no parece ser un requerimiento para la amplificación de dianas procariotas.
4. La amplificación tanto de DNA como de cDNA bacterianos en la misma muestra fue el resultado de PCR positiva más frecuente. Este hecho está a favor de la fiabilidad del procedimiento realizado.
5. Cuando se amplifica únicamente la diana rRNA 16S no puede descartarse la posible detección de otra micobacteria, particularmente en los pacientes con patología músculo-esquelética, una patología frecuentemente asociada a micobacterias diferentes a *M. tuberculosis*.
6. En muestras con cultivo negativo, la amplificación de IS6110 junto a rRNA 16S, esta última como única diana cDNA positiva, podría sugerir la detección de *M. tuberculosis* viables no cultivables.
7. La mayor frecuencia de amplificación de cDNA en las muestras con cultivo positivo, comparadas con las que fueron cultivo negativo (67,8% *versus*

28,9%) indica la detección de bacterias metabólicamente activas, como lo son las que se están dividiendo.

8. La diana que más frecuentemente se detecta en el cDNA de las muestras es el rRNA 16S (28,2%), como era de esperar en relación con su abundancia en las células.
9. El elevado porcentaje en la detección de la diana *ftsZ* en muestras cultivo positivo (42,9%), comparado con el nivel detectado en las muestras cultivo negativo (4%), se deriva probablemente de la función que este producto desarrolla: la formación del septo que separa las células en división.
10. La detección de la diana PCL1 en muestras con cultivo positivo indica que la célula está activamente sintetizando RNA ribosomal. Por ello la amplificación de PCL1 en muestras cultivo positivo ha resultado ser casi 9 veces más frecuente que en muestras cultivo negativo.
11. Se ha detectado *M. tuberculosis* potencialmente latente en el 27,4% de la población estudiada. Este valor concuerda con los datos que se aceptan respecto a la incidencia de la infección latente por *M. tuberculosis*, que se han determinado por la reacción intradérmica de Mantoux (aproximadamente 30%).
12. Únicamente se detecta actividad metabólica en algo más de la mitad de las muestras con bacterias potencialmente latentes, apoyando el estado silente que se supone presenta *M. tuberculosis in vivo* durante la latencia.

Si hay amor por la humanidad, hay amor por el arte de curar

ANEXO A LOS RESULTADOS

1. RESULTADOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS REALIZADOS EN LOS HOSPITALES PARTICIPANTES.

En las tablas siguientes se muestran los resultados de los cultivos y de los estudios de anatomía patológica, clasificadas según sean pulmonares (Tabla I) o extrapulmonares (Tabla II) y separados por hospitales.

La valoración de la tinción de los cultivos se expresa según la escala de cruces tal y como indican las recomendaciones de la Organización Panamericana de la Salud:

- Negativo: no se observan BAAR en 100 campos observados.
- Positivo +: se observan menos de un bacilo por campo en promedio en 100 campos observados.
- Positivo ++: se observan de 1 a 10 bacilos por campo en promedio en 50 campos observados.
- Positivo +++: Se observan más de 10 bacilos por campo en promedio en 20 campos observados.

TABLA Ia-A. MUESTRAS PULMONARES HDO

N° Orden	Microbiología			Anatomía Patológica	
	Muestra	Tinción	Cultivo	Muestra	Resultado
2	Esputo	+++	TB	B. Pulmonar	Bullas enfisematosas
4	Esputo	+	TB		
5	Esputo	+	TB		
7	Esputo	+	TB		
8	Esputo	+++	TB		
9	Esputo	+	TB		
10	Esputo	+++	TB		
11	Esputo	+++	TB		
12	Esputo	+	TB		
13	Esputo	+++	TB		
14	Esputo	+++	TB		
16	Esputo	+	TB		
17	Esputo	+	TB		
18	Esputo	+	TB		
19	Esputo	+	TB		
3	BAL	+	TB		
28	B. bronquial	-	Estéril		
29	B. bronquial	-	Estéril		
39	B. bronquial	-	Estéril		
48	B. bronquial	-	Estéril		
46	B. traqueal	-	Estéril		

Pruebas realizadas en los hospitales participantes

TABLA Ib-A. MUESTRAS PULMONARES FJD

N° Orden	Microbiología			Anatomía Patológica	
	Muestra	Tinción	Cultivo	Muestra	Resultado
12	Espuito	+	TB	BAL	Citología benigna. Linfocitosis.
20	Espuito	+	TB		
38	Espuito	+	TB		
39	Espuito	-	Estéril		
40	Espuito	+	TB		
8	BAL	-	Estéril	BAL	Citología benigna.
13	BAL	-	Estéril	BAL	Citología benigna.
15	BAL	-	Estéril	BAL	Citología benigna.
16	BAL	-	Estéril	BAL	Citología benigna.
23	BAL	-	Estéril	BAL	Citología benigna.
24	BAL	-	Estéril	BAL	Abundantes acúmulos de <i>Pneumocystis carinii</i> .
25	BAL	-	Estéril	BAL	Abundantes acúmulos de <i>Pneumocystis carinii</i> .
26	BAL	-	Estéril	BAL	Citología benigna.
27	BAL	-	Estéril	BAL	Citología benigna.
28	BAL	-	Estéril	BAL	Citología benigna.
34	BAL	-	Estéril	BAL	Citología benigna.
42	BAL	-	Estéril	BAL	Citología benigna.
43	BAL	-	Estéril	BAL	Citología benigna.
44	BAL	-	Estéril	BAL	Citología benigna.
45	BAL	-	Estéril	BAL	Abundantes hematíes. Citología benigna.
46	BAL	-	Estéril	BAL	Abundantes leucocitos. Citología benigna.
36	B. Bronquial	-	Estéril	B. Bronquial	Citología benigna.
37	B. Bronquial	-	Estéril	B. Bronquial	Citología benigna.
17	B. Transbronquial	-	Estéril	B. Transbronquial	Cambios reactivos inespecíficos.

TABLA I-A: Resultados de los laboratorios clínicos en muestras pulmonares. Las muestras se han ordenado según el origen hospital del que se han obtenido, y están agrupadas en Espuito (fondo verde), Bronquiales (fondo amarillo) y Otros (fondo naranja). Los resultados de la tinción se expresan según la escala mencionada en el texto.

TB, *Mycobacterium tuberculosis*. B, Biopsia. BAL, Lavado Bronquial. Estéril, no creció ningún microorganismo en el cultivo.

Pruebas realizadas en los hospitales participantes

Son de un mismo paciente las siguientes muestras pulmonares: 36 y 37; 38 y 40 de la FJD. La muestra 15 pulmonar de la FJD es del mismo paciente que la muestra 2 extrapulmonar (Tabla II-A).

Los resultados indicados en la tabla fueron cedidos por los laboratorios de Microbiología y de Anatomía Patológica del HDO y de la FJD respectivamente.

TABLA IIa-A. MUESTRAS EXTRAPULMONARES HDO

N° Orden	Microbiología			Anatomía Patológica	
	Muestra	Tinción	Cultivo	Muestra	Resultado
1	Adenopatía	+	TB	Adenopatía	Granulomas epitelioides necrotizantes.
6	Adenopatía	+	TB		
15	Adenopatía	-	Estéril		
49	Adenopatía	+	TB		
50	Adenopatía	+	TB	Adenopatía	Inflamación crónica granulomatosa no necrotizante.
53	Adenopatía	-	Estéril		
21	Orina	-	Estéril	M.O.	Sin hallazgos.
23	Orina	-	Estéril		
24	Orina	-	Estéril		
30	Orina	-	Estéril		
34	Orina	-	Estéril		
36	Orina	-	Estéril		
54	Orina	+	TB		
32	L.C.R.	-	Estéril	L.C.R.	Citología normal.
33	L.C.R.	-	Estéril		
35	L.C.R.	-	Estéril		
37	L.C.R.	-	Estéril		
25	Lq. Pleural	-	Estéril	PAAF masa Líquido Pleural	Carcinoma. Alteraciones Benignas
26	Lq. Pleural	-	Estéril		
31	Lq. Pleural	-	Estéril		
38	Lq. Pleural	+	TB		
41	Lq. Pleural	-	Contaminado		
45	Lq. Pleural	-	Estéril		
47	Lq. Pleural	-	Estéril	BAL	Negativa para células malignas.
20	B. Pleural	-	Estéril		
27	B. Pleural	-	Estéril		
40	B. Pleural	-	Estéril		
22	Lq. Sinovial	-	Estéril	B. Transbronquial	Sin datos de malignidad
43	Lq. Sinovial	-	Estéril		
42	B. Colon	-	Estéril	B.Colon	Tejido de granulaci6n.

ANEXO A LOS RESULTADOS

Pruebas realizadas en los hospitales participantes

44	B. Gástrica	-	Estéril	
51	Biopsia (*)	+	TB	
52	Exudado (*)	-	Estéril	

TABLA IIb-A. MUESTRAS EXTRAPULMONARES FJD

N° Orden	Microbiología			Anatomía Patológica	
	Muestra	Tinción	Cultivo	Muestra	Resultado
2	M.O.	-	Estéril	M.O.	Carente de imágenes neoplásicas. Foco compatible con leishmaniasis.
5	M.O.	-	Estéril	M.O.	Infiltración focal por linfoma B de células grandes rico en células T e histiocitos.
10	M.O.	-	Estéril	M.O.	Hiperplasia granulocítica con buen gradiente madurativo.
7	Orina	-	Estéril	Orina	Hongos y cristales.
11	Orina	-	Estéril		
14	Orina	-	Estéril		
50	Orina	-	Estéril	Orina	Citología benigna.
3	L.C.R.	-	Estéril	L.C.R.	Citología benigna.
4	L.C.R.	-	Estéril		
18	L.C.R.	-	Estéril		
9	B. Pleural	-	Estéril	Líquido Pleural	Citología benigna. Inflamación aguda
32	B. Pleural	-	Estéril		
22	B. Sinovial	-	Estéril	B. Sinovial	Sinovitis crónica inespecífica.
33	B. Sinovial	-	Estéril		
41	B. Sinovial	-	Estéril		
21	B. Piel	-	Estéril	B. Piel	Infiltrados crónicos perivasculares
35	B. Piel	-	Estéril		
47	B. Piel	-	Estéril	B. Piel	Necrosis cutánea.
6	Absceso	-	Estéril	Absceso	Cúmulo linfoide. No se identifican granulomas.
19	Absceso	-	Estéril	B. Epiplon	Cambios inflamatorios, sin granulomas epitelioides
49	Absceso	+	TB		
31	B. Colon	-	Estéril	B. Colon	Inflamación crónica inespecífica.
48	B. Colon	-	Estéril	B. Colon	Colitis crónica con leves signos de actividad.
1	B. Hepática	-	Estéril	B. Hepática	Citología benigna.
29	Malla	-	Estéril	Malla	Corrección de hernia: signos de infección y abscesificación.
30	B. Seno	-	Estéril	B. Seno	Cambios inflamatorios crónicos inespecíficos.
	Paranasal			Paranasal	

Pruebas realizadas en los hospitales participantes

TABLA II-A: Resultados de los laboratorios clínicos en muestras extrapulmonares.

Las muestras se han ordenado según el hospital de origen del que se han obtenido, y están agrupadas en Médula ósea/Adenopatías (fondo naranja), Líquidos (Líquido cefaloraquídeo [L.C.R.] y Orina) (fondo verde), Pleurales (fondo morado), Sinoviales (fondo amarillo) y Otros (Digestivo, piel, origen desconocido) (fondo azul). Los resultados de la tinción se expresan según la escala mencionada en el texto.

TB, *Mycobacterium tuberculosis*. B, Biopsia. PAAF, Punción-Aspiración con Aguja Fina. L, Líquido. Estéril, no creció ningún microorganismo en el cultivo.

La muestra 41 del HDO dio un resultado de cultivo no valorable por contaminación. (Tabla II-a).

Son de un mismo paciente las muestras extrapulmonares 1 y 5 de la FJD. La muestra 2 extrapulmonar de la FJD es del mismo paciente que la muestra 15 pulmonar (Tabla I-A). Los resultados indicados en la tabla fueron cedidos por los laboratorios de Microbiología y de Anatomía Patológica del HDO y de la FJD respectivamente.

2. RESÚMENES DE LAS HISTORIAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES.**TABLA III-A. PACIENTES CON MUESTRAS CON RESULTADO DE CULTIVO POSITIVO Y PCR NEGATIVA EN TODAS LAS DIANAS**

<u>Nº Orden</u>	<u>Muestra</u>	<u>Sexo</u>	<u>Edad</u>	<u>Nacionalidad</u>	<u>Antecedentes</u>	<u>Clínica</u>	<u>Pruebas</u>	<u>Diagnóstico</u>
2 H	Espuito®	V	35	Rumana			Lesión pleuropulmonar. apex y base Izq	No consta
5 H	Espuito®	V	40		Tabaquismo.	4 meses*	Patrón reticulonodular granulomas calcificados.	No consta
7 H	Espuito®	V	62		Tabaquismo. DM II	3 meses*	Atelectasias LM, cavernas LSI, infiltrado LII.	No consta
13 H	Espuito®	V	43		Tabaquismo. Qx	no se indica duración*	Pérdida de volumen LSD.	TB pulmonar
17 H	Espuito®	V	34		Tabaquismo, laringitis crónica.			No consta
19 H	Espuito®	M	37		Tabaquismo, Neumonía ^{\$} HIV+ C3	2 semanas*: hemoptisis.	Lesiones cavitadas periféricas bilaterales.	TB pulmonar
38 y 40 F	Espuito®	V	45	Marroquí	Tabaquismo.	2 semanas*: hemoptisis.	Patrón micronodular bilateral con cavitación en LSI y condensación base Dcha.	TB pulmonar

TABLA III-A: Las muestras se identifican según el hospital de procedencia: H, Hospital Doce de Octubre; F, Fundación Jiménez Díaz. En la identificación de las muestras se sigue el mismo esquema de colores indicado en el texto.

* Tos seca o productiva, febrícula o fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso, disfagia o anorexia; \$, diversos episodios infecciosos; DM, Diabetes Mellitus; Qtx, Quimioterapia; TB, Tuberculosis; LM: Lóbulo Medio; LSI: Lóbulo Superior Izquierdo; LII: Lóbulo Inferior Izquierdo; LSD: Lóbulo Superior Derecho.

TABLA IV-A. PACIENTES CON MUESTRAS CON RESULTADO DE CULTIVO Y PCR NEGATIVOS PARA TODAS LAS DIANAS, PERO CON CLÍNICA SUGERENTE DE INFECCIÓN

<u>Nº Orden</u>	<u>Muestra</u>	<u>Sexo</u>	<u>Edad</u>	<u>Antecedentes</u>	<u>Clínica</u>	<u>Pruebas</u>	<u>Diagnóstico</u>
8F	BAL	M	81	Dermatomiositis tratamiento con Corticoides	2 días Fiebre. Tos productiva	Imagen cavitada con nivel en LID	Neumonía por <i>P. aeruginosa</i>
28F	BAL	V	50	TB pulmonar + derrame pleural 2000. Tto un año	1 semana Fiebre, disnea, tos productiva	Condensación hemitórax Izqdo. Absceso LSI, Infiltrado LII	Absceso pulmonar izquierdo
30H	Orina	V	86	EPOC. Neumonías de repetición LII HIV + C3	Crisis tónico-clónica. Febrícula, tos. Tto con ciprofloxacino.	Atelectasia LID derrame pleural	Inicia Tto para TB pese cultivo neg.
2F	Médula ósea	V	44	HIV+ C3 Tratamiento	2 meses. Diarrea, sudoración nocturna ↓ peso	Nódulos hepáticos Infiltrados en tórax	Neumonía por <i>Pneumocistis</i> . Linfoma B
10F	Médula ósea	V	44	LMP. TB en 1980. Neumotórax 2006	Disnea dolor torácico	Atelectasia pulmón Derecho	Neumotórax Dcho Plaquetopenia

TABLA IV-A: Las muestras se identifican según el hospital de procedencia: H, Hospital Doce de Octubre; F, Fundación Jiménez Díaz. En la identificación de las muestras se sigue el mismo esquema de colores indicado en el texto. Todos los pacientes eran de nacionalidad Española. TB, Tuberculosis; EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; Tto: Tratamiento; LMP: Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva; LID: Lóbulo Inferior Derecho; LII: Lóbulo Inferior Izquierdo.

TABLA V-A. PACIENTES CON MUESTRAS CON RESULTADO DE CULTIVO Y PCR NEGATIVOS PARA *M. Tuberculosis*, CON CLÍNICA SUGERENTE DE INFECCIÓN

<u>Nº Orden</u>	<u>Muestra</u>	<u>Sexo</u>	<u>Edad</u>	<u>Antecedentes</u>	<u>Clínica</u>	<u>Pruebas</u>	<u>Diagnóstico</u>
17F	B. transbronquial	V	42	Neumonía, sífilis, VHB, VHC, HIV+ C3	2 días Fiebre, disnea mínimos esfuerzos	Radiografía Tórax: Infiltrados bilaterales	Neumonía por <i>P. carinii</i>
24F	BAL	V	45	Tabaquismo HIV+ C3	2 meses Disnea	Lavado bronquial: <i>P. carinii</i>	Neumonía por <i>P. carinii</i>
31H	Lq. pleural	V	59	DMNID, DL, Miocardiopatía restrictiva, MP	Disnea Postransplante cardíaco	Rx Tx: Infiltrado derrame pleural Dcho. Mantoux +	Insuficiencia respiratoria Shock séptico
47H	Lq. pleural	V	43	Tabaquismo Drogodependiente	Fiebre. Dolor torácico		Neumonía sin filiación
18F	LCR	V	81	DMNID, Adenoma de próstata.	1 semana Disartria, Alucinaciones. Desorientación.		Síndrome febril sin filiar
19F	Absceso intraabdominal	M	58	IRC en diálisis, TB en 2000, VHC,	Fiebre Peritonitis	inflamatorios en biopsia epiplon	Shock séptico perforación de colon
35F	B. piel	V	42	Tratamiento con inmunosupresores	4 meses. Nódulos eritematosos MI	Tumefacción maleolo interno	Pioderma gangrenoso

TABLA V-A: Las muestras se identifican según el hospital de procedencia: H, Hospital Doce de Octubre; F, Fundación Jiménez Díaz. En la identificación de las muestras se sigue el mismo esquema de colores indicado en el texto. Todos los pacientes eran de nacionalidad Española. TB: Tuberculosis; VHB: Virus Hepatitis B; VHC: Virus Hepatitis C; DMNID: Diabetes Mellitus No Insulín Dependiente; DL: Dislipemia; MP: Marcapasos; IRC: Insuficiencia Renal Crónica; MI: Miembros Inferiores.

TABLA VIa-A. PACIENTES CON MUESTRAS PULMONARES POSITIVAS PARA DNA BACTERIANO

<u>Nº Orden</u>	<u>Muestra</u>	<u>Sexo</u>	<u>Edad</u>	<u>Nacionalidad</u>	<u>Antecedentes</u>	<u>Clínica</u>	<u>Pruebas</u>	<u>Diagnóstico / comentarios</u>
25 F	BAL	V	33	Argentina	LUES secundaria [§] HIV+ estadio C3	4 meses*	Infiltrado intersticial bilateral.	Neumonía por <i>P. jirovecii</i>
42 F	BAL	V	32		Adenoidectomía , Tabaquismo.	1 año: hemoptisis.	TAC Torácico: Opacidades en vidrio deslustrado peribronquiales.	Bronquiolitis infecciosa
46 F	BAL	M	82		HTA.	2 meses*	Patrón intersticial difuso periférico.	Fibrosis pulmonar
40F	Espuito©	V	45	Marroquí	Tabaquismo	2 semanas* hemoptisis	Patrón micronodular con cavitación. Mantoux +	TB pulmonar

TABLA VIb-A. PACIENTES CON MUESTRAS EXTRAPULMONARES POSITIVAS PARA DNA BACTERIANO

<u>Nº Orden</u>	<u>Muestra</u>	<u>Sexo</u>	<u>Edad</u>	<u>Nacionalidad</u>	<u>Antecedentes</u>	<u>Clínica</u>	<u>Pruebas</u>	<u>Diagnóstico / comentarios</u>
23 H	Orina	M	63		Tabaquismo, ITU, reflujo ureteral.	Síndrome miccional.		Reflujo vesico-ureteral
24 H	Orina	V	32		Trasplante renal, Ca papilar de tiroides.	Fiebre	Infiltrado LID	Neumonía LID
35H	LCR	V	75	Irán	Candidiasis oral y faríngea, Diarrea por Shigella, LMP. HIV + C3	4 días: Tª 39°C, disminución del nivel de conciencia.	Roncus hemiplejia derecha	FOD Qpx con INH en 2001.
20 H	B. pleural	M	2		No.	Fiebre.	Derrame pleural	Neumonía Empiema
26 H	Lq. pleural	V	66		Mieloma múltiple en Tto Qtx.	Ascitis, derrame torácico.	Derrame pleural	Carcinomatosis diseminada
27 H	B. pleural	M	67		Tabaquismo, derrame pleural Izd, Carcinoma urotelial, Adenocarcinoma de colon, FA.	Ingreso para estudio de imágenes nodulares en hemitórax Izdo.	Derrame pleural	Pleuropatía
40 H	B. pleural	M	67		IRC 2ª a poliquistosis hepatorenal, en tto con hemodiálisis, Trasplante renal, ITU, VHZ en MSD, Hipotiroidismo.	10 días: Disnea de mínimos esfuerzos con astenia.	Derrame pleural masivo	Quilotórax
45H	Lq. pleural	V	75		Tabaquismo, EPOC, SAOS, FA, ICC, IAM,	Estudio imagen nodular en LII.	Derrame pleural bilateral	Sospecha de carcinoide pulmonar

22 H	Líquido sinovial	M	40		Carcinoma mama izquierda	Dolor hombro izquierdo.	Derrame articular	Monoartritis fúngica
42 H	B. colon	M	74		Colecistectomía.	Estreñimiento, dolor abdominal.	Mantoux +	Sospecha de Úlcera Ileocecal
44 H	B. gástrica	M	50		Enfermedad de Crohn, Artritis degenerativa, Esteatosis hepática.	6 meses: tos crónica sin expectoración.	Espirometría con restricción leve	No consta
31F	B. colon	V	41		Trasplante renal en 1998 en tratamiento con inmunosupresores.	3 semanas: diarrea, febrícula, pérdida de peso.	Abdomen timpánico	Respuesta secundaria a inmunosupresores

TABLA VI-A. Las muestras se identifican según el hospital de procedencia: H, Hospital Doce de Octubre; F, Fundación Jiménez Díaz. En la identificación de las muestras se sigue el mismo esquema de colores indicado en el texto.

* Tos productiva, febrícula, pérdida de peso, dolor torácico. \$, diversos episodios infecciosos. TB: Tuberculosis; HTA: Hipertensión Arterial; ITU: Infección Tracto Urinario; Ca: Carcinoma; LID: Lóbulo Inferior Derecho; FOD: Fiebre de Origen Desconocido; Tto: Tratamiento; Qtx, Quimioterapia; Qpx, Quimioprofilaxis; INH, Isoniazida; IRC: Insuficiencia renal crónica; FA: Fibrilación Auricular; MSD: Miembro Superior Derecho; LII: Lóbulo Inferior Izquierdo; EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; SAOS: Síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño; ICC: Insuficiencia Cardíaca Congestiva; VHZ: Virus Hérpes Zóster.

TABLA VIIa-A. PACIENTES CON MUESTRAS PULMONARES POSITIVAS PARA cDNA BACTERIANO

<u>N° Orden</u>	<u>Muestra</u>	<u>Sexo</u>	<u>Edad</u>	<u>Nacionalidad</u>	<u>Antecedentes</u>	<u>Clínica</u>	<u>Pruebas</u>	<u>Diagnóstico / comentarios</u>
11 H	Esputo®	V	45		Tabaquismo, Alcoholismo, Cocaína inhalada	2 meses Fiebre, ↓ Peso, tos, hemoptisis.	AP: roncus vértices. Infiltrado LSD, nódulo LSI	TB pulmonar
12 F	Esputo®	V	49		Tabaquismo, ADVP, VHC, VHI + estadío C3.	Disnea, Fiebre.	Disminución importante MV. Consolidación cavitada LSI y pérdida de volumen LSI.	TB pulmonar EPOC
20F	Esputo®	M	22	Rumana.	Derrame pleural. Marido TB en Tto.	Dolor torácico, fiebre. ↓ Peso.	AP: Crepitantes base Dcha. Signos de enfisema pulmonar.	TB pulmonar
39 H	B. bronquial	V	62		Tabaquismo, Alcoholismo, Heroína fumada	Disnea, dolor torácico.	Tractos pleuroparenquimatosos, Imágenes calcificadas Mantoux (-).	EPOC. Tto corticoides

TABLA VII-A. Las muestras se identifican según el hospital de procedencia: H, Hospital Doce de Octubre; F, Fundación Jiménez Díaz. En la identificación de las muestras se sigue el mismo esquema de colores indicado en el texto.

TB: Tuberculosis; HTA: Hipertensión Arterial; ITU: Infección Tracto Urinario; ADVP: Adicto a Drogas Vía Parenteral; VHC: Virus Hepatitis C; LSD: Lóbulo Superior Derecho; LSI: Lóbulo Superior Izquierdo; Tto: Tratamiento; Qtx, Quimioterapia; IRC: Insuficiencia renal crónica; IS: Tratamiento Inmunosupresor; DM: Diabetes Mellitus; TAC Tx: Tomografía Axial Computerizada de Tórax; RM: Resonancia Magnética.

TABLA VIIb-A. PACIENTES CON MUESTRAS EXTRAPULMONARES POSITIVAS PARA cDNA BACTERIANO

<u>Nº Orden</u>	<u>Muestra</u>	<u>Sexo</u>	<u>Edad</u>	<u>Nacionalidad</u>	<u>Antecedentes</u>	<u>Clínica</u>	<u>Pruebas</u>	<u>Diagnóstico / comentarios</u>
49 H	Adenopatía®	V	32		Rinitis, asma alérgica	Adenopatías mediastínicas. Nódulos pulmonares	Inflamación crónica granulomatosa	TB pulmonar
34 H	Orina	M	65		IRC, Trasplante renal, IS, DM.	2 días. Fiebre. Diarrea.	Dolor hipocondrio Dcho. Mantoux (-).	Bacteriemia <i>E. coli</i>
11F	Orina	M	81		HTA, Artritis reumatoide, IS, ITUs de repetición.	Astenia, Fiebre, Síndrome miccional.	Bradipsíquica, Fiebre. AP: crepitantes en las bases.	Sepsis <i>E. coli</i>
43H	Lq. sinovial	V	41	Nigeriana		Dolor rodilla Dcha.	Movilidad limitada, Dolor a la palpación.	Artritis
33F	B. sinovial	V	78		HTA, Prótesis de cadera.	Recambio prótesis cadera Dcha.		Recambio prótesis
1F	B. hepática	V	50		Tabaquismo, Neoplasia en Tto con Qtx	Lesiones hepáticas.	TAC Tx: bronquiectasias, derrame pleural	Infección hepática
6F	Absceso	M	5		Dolor en región lumbar.	Flexión ventral como postura antiálgica.	RM: edematización L3, afectación discal, absceso epidural. Mantoux (-).	Aplastamiento vertebral traumático
29F	Malla	V	43		Hernioplastia umbilical.	Intolerancia a la malla abdominal.		Cambio de malla

TABLA VIIIa-A. PACIENTES CON MUESTRAS PULMONARES POSITIVAS PARA DNA Y cDNA BACTERIANOS

<u>Nº Orden</u>	<u>Muestra</u>	<u>Sexo</u>	<u>Edad</u>	<u>Nacionalidad</u>	<u>Antecedentes</u>	<u>Clínica</u>	<u>Pruebas</u>	<u>Diagnóstico / comentarios</u>
14H	Esputo®	V	28		Tabaquismo, Neumotórax de repetición.	Delgadez.	Imagen cavitada en el segmento VI Dcho. Mantoux (-)	TB pulmonar
18H	Esputo®	V	26	Boliviana	Tabaquismo. Contactos con pacientes TB.	Tos, dolor, hemoptisis, ↓ Peso.	AP: pectoriloquia en 1/3 sup. hemitórax Izd.	TB pulmonar
8H	Esputo®	V	40	Rumana	Tabaquismo. TB tratada,	Dolor torácico.	Fracturas costales, Neumotórax Izdo.	Neumotórax traumático
39F	Esputo	V	77		Tabaquismo, DM, Vitíligo, Polio, LLC, IS	3 días. Tos, dolor torácico, Fiebre.	Condensación en LII y derrame pleural Izdo. Herpes labial. AP: roncus, sibilancias, disminución MV en base Izda.	Neumonía neumocócica
26F	Lq. bronquial	V	66		HTA.	Tos. Toma de HCTz	Infiltrado intersticial en HT Dcho. Crepitantes en campos medios.	Neumonitis por HCTz
27F	Lq. bronquial	M	79		HTA, VHC, Sd L.		Atelectasia del LM.	Estenosis benigna LM
43F	Lq. bronquial	V	40	Peruana	Colon irritable.	1 año. Hemoptisis.	TAC Tx: Bullas subpleurales.	Sin determinar
44F	Lq. bronquial	V	53		NFM tipo I, Paraparesia extásica, Meningocele torácico.	Masa pleural	TAC Tx: lesión en HT Dcho con calcificaciones.	Neurofibroma

TABLA VIIIb-A. PACIENTES CON MUESTRAS EXTRAPULMONARES POSITIVAS PARA DNA Y cDNA BACTERIANOS

<u>N° Orden</u>	<u>Muestra</u>	<u>Sexo</u>	<u>Edad</u>	<u>Nacionalidad</u>	<u>Antecedentes</u>	<u>Clínica</u>	<u>Pruebas</u>	<u>Diagnóstico / comentarios</u>
23 H	Orina	M	63		Tabaquismo, ITU, reflujo ureteral.	Síndrome miccional.		Reflujo vesico-ureteral
24 H	Orina	V	32		Trasplante renal, Ca papilar de tiroides.	Fiebre	Infiltrado LID	Neumonía LID
35H	LCR	V	75	Irán	Candidiasis oral y faríngea, Diarrea por Shigella, LMP. HIV + C3	4 días: Tª 39°C, disminución del nivel de conciencia.	Roncus hemiplejia derecha	FOD Qpx con INH en 2001.
20 H	B. pleural	M	2		No.	Fiebre.	Derrame pleural	Neumonía Empiema
26 H	Lq. pleural	V	66		Mieloma múltiple en Tto Qtx.	Ascitis, derrame torácico.	Derrame pleural	Carcinomatosis diseminada
27 H	B. pleural	M	67		Tabaquismo, derrame pleural Izd, Carcinoma urotelial, Adenocarcinoma de colon, FA.	Ingreso para estudio de imágenes nodulares en hemitórax Izdo.	Derrame pleural	Pleuropatía
40 H	B. pleural	M	67		IRC 2ª a poliquistosis hepatorrenal, en tto con hemodiálisis, Trasplante renal, ITU, VHZ en MSD, Hipotiroidismo.	10 días: Disnea de mínimos esfuerzos con astenia.	Derrame pleural masivo	Quilotórax
45H	Lq. pleural	V	75		Tabaquismo, EPOC, SAOS, FA, ICC, IAM,	Estudio imagen nodular en LII.	Derrame pleural bilateral	Sospecha de carcinoide pulmonar

22 H	Líquido sinovial	M	40		Carcinoma mama izquierda	Dolor hombro izquierdo.	Derrame articular	Monoartritis fúngica
42 H	B. colon	M	74		Colecistectomía.	Estreñimiento, dolor abdominal.	Mantoux +	Sospecha de Ulcera Ileocecal
44 H	B. gástrica	M	50		Enfermedad de Crohn, Artritis degenerativa, Esteatosis hepática.	6 meses: tos crónica sin expectoración.	Espirometría con restricción leve	No consta
31F	B. colon	V	41		Trasplante renal en 1998 en tratamiento con inmunosupresores.	3 semanas: diarrea, febrícula, pérdida de peso.	Abdomen timpánico	Respuesta secundaria a inmunosupresores

TABLA VIII-A. Las muestras se identifican según el hospital de procedencia: H, Hospital Doce de Octubre; F, Fundación Jiménez Díaz. En la identificación de las muestras se sigue el mismo esquema de colores indicado en el texto.

HTA: Hipertensión Arterial; TB: Tuberculosis; AP: Auscultación Pulmonar; LLC: Leucemia Linfática Crónica; DM: Diabetes Mellitus; IS: tratamiento con Inmunosupresores; VHC: Virus Hepatitis C; Sd L: Síndrome Linfoproliferativo; NFM: Neurofibromatosis; HCTz: Hidroclorotiazida; TAC Tx: Tomografía Axial Computerizada; LM: Lóbulo Medio; LII: Lóbulo Inferior Izquierdo; MI: Miembros Inferiores; MV: Murmullo Vesicular; LSD: Lóbulo Superior Derecho; ACVA: Accidente Cerebrovascular; MM: Mieloma Múltiple.

ABREVIATURAS

A	Adenina
a.c.	Antes de Cristo
ACVA	Accidente Cerebrovascular
ADA	Adenosín Deaminasa
ADVP	Adicto a Drogas Vía Parenteral
AGP	<i>alpha1-acid glycoprotein</i>
AN	Ácidos Nucleicos
AP	Auscultación Pulmonar
Atb	Antibiótico
B.	Biopsia
BAL	Lavado Bronquial
BAAR	Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes
BCG	Bacilo de Calmette y Güerin
C	Citosina
°C	Grados centígrado
Ca	Carcinoma
cc	centímetros cúbicos
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
Cp	Punto de cruce de la curva
CPF 10	<i>culture filtrate protein 10</i>
C_T	Threshold Cycle
DEPC	Dietilpirocarbonato
DL	Dislipemia
DM	Diabetes Mellitus
DMNID	Diabetes Mellitus No Insulín Dependiente
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
DOT	Directly Observed Treatment
E	Etambutol
EDO	Enfermedad de Declaración Obligatoria
EEUU	Estados Unidos
ELISA	Enzimoimmunoanálisis
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ESAT-6	<i>Early secretory antigenic target-6</i>
FA	Fibrilación Auricular
FJD	Fundación Jiménez Díaz
FOD	Fiebre de Origen Desconocido
G	Guanina
H	Isoniazida
HCTz	Hidroclorotiazida

HDO	Hospital Doce de octubre
HTA	Hipertensión Arterial
IAP	<i>immunosuppressive acidic protein</i>
ICC	Insuficiencia Cardíaca Congestiva
IFN-γ	interferón-gamma
IGRA	<i>interferon-gamma release assay</i>
INH	Isoniazida
IRC	Insuficiencia Renal Crónica
IS	Inmunosuprimido
ITU	Infección del Tracto Urinario
Izda	Izquierda
Kb	Kilo bases
Kg	Kilogramo
Lq.	Líquido
L.C.R.	Líquido Cefalorraquídeo
LID	Lóbulo Inferior Derecho
LII	Lóbulo Inferior Izquierdo
LLC	Leucemia Linfática Crónica
LM	Lóbulo Medio
LMP	Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva
LSD	Lóbulo Superior Derecho
LSI	Lóbulo Superior Izquierdo
M	Molar
MAC	<i>Mycobacterium avium complex</i>
mg	miligramo
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
MI	Miembros Inferiores
mL	Mili litros
mm³	Milímetros cúbicos
MM	Mieloma Múltiple
M.O.	Médula Ósea
MP	Marcapasos
MRD-Tb	Tuberculosis Multirresistente
MSD	Miembro Superior Derecho
M. tb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MV	Murmullo Vesicular
Neg	Negativo
NFM	Neurofibromatosis
ng	nanogramos
nt	Nucleótidos
n°F	Muestra recogida en la Fundación Jiménez Díaz
n°H	Muestras recogidas en el Hospital Doce de Octubre
OMS	Organización Mundial de la Salud

ONU	Organización de las Naciones Unidas
PAAF	Punción-Aspiración con Aguja Fina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCRtr	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
pg	picogramos
Pos	Positivo
PT	Prueba de la Tuberculina
Qpx	Quimioprofilaxis
Qtx	Quimioterapia
R	Rifampicina
RD	Regiones de Deleción
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RM	Resonancia Magnética
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
S	Estreptomicina
SAOS	Síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño
Sd L	Síndrome Linfoproliferativo;
sg	segundos
SI	Secuencia de inserción
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
T	Timina
Tª	Temperatura
TAC Tx	Tomografía Axial Computerizada de Tórax
TB	Tuberculosis
Tm	Temperatura de fusión
Tto	Tratamiento
U	Unidades
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UNG	uracil-N-glicosilasa
UV	Ultravioleta
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHC	Virus de la Hepatitis C
VHZ	Virus Hérpes Zóster
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
WHO	World Health Organization
XRD-Tb	Tuberculosis Extremadamente Resistente
Z	Pirazinamida
µl	micro litros
µg	micro gramos

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS y GRÁFICOS

FIGURAS	Página
FIGURA 1: Incidencia de la TB en el mundo según la OMS 2008	1
FIGURA 2: <i>La Miseria</i> , de Cristóbal Rojas	6
FIGURA 3: Grabado Egipcio	7
FIGURA 4: Papiro Ebers	7
FIGURA 5: Busto de Hipócrates	8
FIGURA 6: Enrique IV de Francia tocando a numerosos enfermos durante la ceremonia del "Toque Real"	9
FIGURA 7: Laennec auscultando a uno de sus pacientes en el Hospital Necker por Théobald Chartran	10
FIGURA 8: Robert Koch	11
FIGURA 9: Cruz de Lorena, símbolo internacional de la lucha contra la tuberculosis	13
FIGURA 10: <i>La primavera</i> , El nacimiento de Venus	16
FIGURA 11: <i>El grito</i> de Edwar Munch	16
FIGURA 12: Esquema de la pared de las Micobacterias	18
FIGURA 13: Modelo de la estructura secundaria del RNA 16S	22
FIGURA 14: <i>Ciencia y Caridad</i> (Pablo Ruiz Picasso, 1897)	23
FIGURA 15: Transmisión aérea	24
FIGURA 16: Inmunopatogénesis de la tuberculosis pulmonar	25
FIGURA 17: Prueba de la tuberculina	26
FIGURA 18: Patrones de decisión ante una sospecha clínica de tuberculosis pulmonar	30
FIGURA 19: Radiografía de tórax	32
FIGURA 20: Muestra teñida	36
FIGURA 21: Colonias en medio sólido	37
FIGURA 22: Inoculación de un vial de BACTEC	39
FIGURA 23: Viales de BACTEC	40
FIGURA 24: Termociclador	46
FIGURA 25: Esquema de la reacción de PCR	47
FIGURA 26: Termociclador Light Cycler para PCRtr	51
FIGURA 27: Fases de la PCR en tiempo real	51
FIGURA 28: Fluorescencia medida por SYBR Green I	52

TABLAS DEL ANEXO	Página
TABLA I-A.	
a) Muestras pulmonares HDO	135
b) Muestras pulmonares FJD	136
TABLA II-A.	
a) Muestras extrapulmonares HDO	137
b) Muestras extrapulmonares FJD	138
TABLA III-A. Pacientes con cultivo + y PCR - para todas las dianas	141
TABLA IV-A. Pacientes cultivo - y PCR - para todas las Dianas con clínica sugerente de infección	142
TABLA V-A. Pacientes cultivo - y PCR - para <i>M. tuberculosis</i> con clínica sugerente de infección	143
TABLA VI-A.	
a) Pacientes con muestras pulmonares + para DNA bacteriano	144
b) Pacientes con muestra extrapulmonares + para DNA bacteriano	145
TABLA VII-A.	
a) Pacientes con muestras pulmonares + para cDNA bacteriano	147
b) Pacientes con muestras extrapulmonares + para cDNA bacteriano	148
TABLA VIII-A.	
a) Pacientes con muestras pulmonares + para DNA y cDNA bacterianos	149
b) Pacientes con muestras extrapulmonares + para DNA y cDNA bacterianos	150

GRÁFICOS	Página
GRÁFICO I. Aislamiento de Ácidos Nucleicos de muestras clínicas frescas	76
GRÁFICO II. Edad de los hombres	102
GRÁFICO III. Edad de las mujeres	102
GRÁFICO IV. Distribución por edad	103



BIBLIOGRAFÍA CITADA

- . " <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>"
- . "http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/B_Rilova/Copia%20de%20proyectoBIO/SECUENCIACION/secuenciacion.htm."
- . "http://ecdc.europa.eu/en/Health_Topics/tuberculosis/aer_07.aspx."
- . "<http://new.tballiance.org>."
- . "<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00054407.htm>."
- . "<http://www.cdc.gov/nchstp/tb/pubs/tbfactsheets/250120.htm>."
- . "<http://www.elmundo.es/elmundosalud/2007/03/23/biociencia/1174651187.html>."
- . "<http://www.genomesonline.org>"
- . "<http://www.genmico.unizar.es>"
- . "<http://new.tballiance.org>"
- . "<http://www.phppo.cdc.gov/dls/ila/documents/lstc2.pdf>."
- . "<http://www.phppo.cdc.gov/dls/ila/documents/lstc3.pdf>."
- . "http://www.separ.es/noticias/incidencia_tuberculosis_reparto_riqueza.html."
- . "http://www.separ.es/noticias/tuberculosis_Espana_noveno.html."
- . "<http://www.stoptb.org/>."
- . "<http://www.tuberculist.fr>"
- . "<http://www.tuberculosisistextbook.com>"
- . "<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr42/es/index.html>."
- . "http://www.who.int/tb/challenges/hiv/tbhiv_collaborative_activities_es.pdf."
- . "http://www.who.int/tb/xdr/taskforcereport_oct06.pdf."
- . "http://www.who.int/vaccine_research/diseases/tb/en."

- Alcaide, F., M. Benítez, et al. (2000). "Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe" J Clin Microbiol **38**(1): 398-401.
- American Thoracic Society (2000). "Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children." Am J Respir Crit Care Med **161** (4 Pt 1): 1376-95.
- American Thoracic Society (2000). "Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection." Am J Respir Crit Care Med **161**: S221-S47.
- American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention /Infectious Diseases Society of America (2003). "Treatment of tuberculosis " Am J Respir Crit Care Med **167**: 603-62.
- Andersen, P, M. Munk, et al. (2000). "Specific immunebased diagnosis of tuberculosis." Lancet **356**: 1099-104.
- Andries, K., P. Verasselt, et al. (2005). "A diarylquinolone drug active on the ATP-synthase of *Mycobacterium tuberculosis*." Science **307**: 223-227.
- Arend, S., P. Andersen, et al. (2000). "Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10." J Infect Dis **181**(5): 1850-4.
- Aston, N. (1997). "Abdominal tuberculosis." World J Surg **21**(5): 492-9.
- Aziz MA, A. Wright, et al. (2006). "Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis." Lancet **368**(9553): 2142-54.
- Badak, F., D. Kiska, et al. (1996). "Comparison of mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens" J Clin Microbiol **34**(9): 2236-9.
- Baess, I. (1978). "Determination of genome size and base ratio on deoxyribonucleic acid from mycobacteria" Acta Pathol Microbiol Scand **86 B**: 309-312.
- Bañales, J., P. Pineda, et al. (1991). "Adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusions. A report of 218 patients and review of the literature." Chest **99**(2): 355-7.
- Barer, M. and C. Harwood (1999). "Bacterial viability and colourability" Adv Microb Physiol **41**: 93-137.
- Barmen, K., J. Haagensen, et al. (2007). "Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections." Clin Chim Acta **384**(1-2): 1-11.
- Bastien, P., G. Procop, et al. (2008). "Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR." J Clin Microbiol **46**(6): 1897-900.

- Bateman, T. (1779). Reports on the Diseases of London.
- Bauer HM, Ting YT, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ *et al.* (1991). "Genital human *Papillomavirus* infection in female university students as determined by a PCR-based method". JAMA **265**:472-477.
- Behr, M. A. (2002). "BCG: different strains, different vaccines? " Lancet Infect Dis **2**(2): 86-92.
- Blumberg, H., M. Leonard, Jr., et al. (2005). "Update on the treatment of tuberculosis and latent tuberculosis infection." JAMA **293**(22): 2776-84.
- Broakmans, J., G. Migliori, et al. (2002). "European framework for tuberculosis control and elimination in countries with a low incidence. Recommendations of the World Health Organization (WHO), International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) and Royal Netherlands Tuberculosis Association (KCV) Working Group." Eur Respir J **19**: 765-75.
- Brock, I., M. Munk, et al. (2001). "Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10." Int J Tuberc Lung Dis **5**: 462-7.
- Brock, T. (1988). Robert Koch: A Life in Medicine and Bacteriology, Science Tech Publishers.
- Brunello, F., F. Favari, et al. (1999). "Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria from various clinical specimens." J Clin Microbiol **37**(4): 1206-9.
- Burgess, L., F. Maritz, et al. (1996). "Combined use of pleural adenosine deaminase with lymphocyte/neutrophil ratio. Increased specificity for the diagnosis of tuberculous pleuritis." Chest **109**(2): 414-9.
- Burman, W. and R. Reves (2000). "Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment." Clin Infect Dis **31**(6): 1390-5.
- Burman, W., S. Goldberg, et al. (2006). "Moxifloxacin versus Ethambutol in the first 2 months of treatment for pulmonary tuberculosis " Am J Resp Crit Care Med **174**: 331-338.
- Caminero Luna, J. (2003). Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. International union against tuberculosis and lung disease. Paris.
- Canetti, G. (1950). The Tubercle Bacillus in the Pulmonary Lesion of Man. New York.
- Canetti, G., W. Fox, et al. (1969). "Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes." Bull World Health Organ **41**(1): 21-43.
- Canetti, G., S. Froman, et al. (1963). "Mycobacteria: Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. ." Bull World Health Organ **29**: 565-78.

- Cardona, P. (2007). "New insights on the nature of latent tuberculosis infection and its treatment." Inflamm Allergy Drug Targets **6**(1): 27-39.
- Cardona, P., A. Cooper, et al. (1999). "The intravenous model of murine tuberculosis is less pathogenic than the aerogenic model owing to a more rapid induction of systemic immunity." Sand J Immunol **49**: 362-6.
- Casal, M., J. Gutierrez, et al. (1997). "Comparative evaluation of the mycobacteria growth indicator tube with the BACTEC 460 TB system and Löwenstein-Jensen medium for isolation of mycobacteria from clinical specimens" Int J Tuberc Lung Dis **1**(1): 81-4.
- Chan, E., L. Heifets, et al. (2000). "Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review." Tuber Lung Dis **80**(3): 131-40.
- Clark-Curtiss, J. and S. Hayde (2003). "Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis." Annu Rev Microbiol **57**: 517-49.
- Cole, S. and B. Barrell (1998). "Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv." Novartis Found Symp **217**: 160-72.
- Cole, S., J. Parkhill, et al. (1998). "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence." Nature **393**: 537-44.
- Corbel MJ, Fruth U, Griffiths E, Knezevic (2004) "Report on a WHO consultation on the characterisation of BCG strains" Vaccine **22**(21-22):2675-80.
- Cosma, C., D. Sherman, et al. (2003). "The secret lives of the Pathogenic Mycobacteria." Annual Review of Microbiology **57**: 641-76.
- Dafne, M. and P. Draper (1998). "The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity" Advances Microbial Physiology **39**: 131-203.
- Dahl, J. (2005). "Scanning electron microscopy analyses of aged *Mycobacterium tuberculosis* cells." Canadian Journal Microbiology **51**: 277-81.
- Dahl, J., C. Kraus, et al. (2003). "The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice." Proc Natl Acad Sci USA **100**: 10026-31.
- de Gracia, J., V. Curull, et al. (1988). "Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in suspected pulmonary tuberculosis." Chest **93**(2): 329-32.
- Deb, C., C-M Lee, et al. (2009). "A novel *in vitro* multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen". PloS ONE **4**(6):e6077. Doi:10.1371/journal.pone.0006077.
- Della-Latta, P. and S. Whittier (1998). "Comprehensive evaluation of performance, laboratory application, and clinical usefulness of two direct amplification technologies for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex." Am J Clin Pathol **110**(3): 301-10.

- DeMaio, J., Y. Zhang, et al. (1996). "A stationary phase stress-response sigma factor from *Mycobacterium tuberculosis*." Proc Natl Acad Sci USA **93**: 2790-4.
- Diacon, A., W. Van de Wal B, et al. (2003). "Diagnostic tools in tuberculous pleurisy: a direct comparative study." Eur Respir J **22**(4): 589-91.
- Domínguez, J. and J. Ruiz-Manzano (2006). "Prueba de la tuberculina: ¿es la hora del cambio?" Arch Bronconeumol **42**: 47-8.
- Domínguez, J., J. Ruiz-Manzano, et al. (2008). "Comparison of two commercially available interferon-gamma blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis infection." Clin Vaccine Immunol **15**: 168-71.
- Dorransoro, I., C. Martín, et al. (2000). "Effect of the number of samples studied on the diagnosis of tuberculosis." Enferm Infecc Microbiol Clin **18**(5): 215-8.
- Dubnau, E., P. Fontan, et al. (2002). "*Mycobacterium tuberculosis* genes induced during infection of human macrophages." Infect Immun **70**: 2787-95.
- Dye, C., S. Scheele, et al. (1999). "Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project." JAMA **282**: 677-86.
- Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT (1990). "Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*." J Infect Dis **161**: 977-981.
- Falkinham, J., 3er. (1996). "Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria." Clin Microbiol Rev **9**: 177-215.
- Finch, D. and C. Beaty (1997). "The utility of a single sputum specimen in the diagnosis of tuberculosis. Comparison between HIV-infected and non-HIV-infected patients." Chest **111**(5): 1174-9.
- Fleischmann, R., J. Eisen, et al. (2002). "Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains." J Bacteriol **184**: 5479-90.
- Florckzyk, M., L. McCue, et al. (2003). "A family of *acr*-coregulated *Mycobacterium tuberculosis* genes shares a common DNA motif and requires Rv 3133c /*dosR* or *devR*) for expression." Infect Immun **71**: 5332-43.
- Frieden, T., T. Sterling, et al. (2003). "Tuberculosis." Lancet **362**(9387): 887-99.
- Gandhi, N., A. Moll, et al. (2006). "Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa." Lancet **368**(9547): 1575-80.
- García-de-Viedma, D. (2003). "Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches." Clin Microbiol Infect **9**(5): 349-59.
- García-Gual, C., M. Lara-Nava, et al. (1983). Comentarios de los tratados Hipocráticos.

Madrid.

- Garton, N., H. Christensen, et al. (2002). "Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria in vitro and in sputum." Microbiology **148**: 2951-8.
- Garton, N., S.J., Waddell, A.L. Sherrat, et al. (2008) "Cytological and transcript analysis reveal fat and lazy persistent-like bacilli in tuberculous sputum." PLoS Med.: 5:e75.Doi:10.1371/journal.pmed.0050075.
- Geng, E., B. Kreiswirth, et al. (2005). "Clinical and radiographic correlates of primary and reactivation tuberculosis." JAMA **293**: 2740-5.
- Gennaro, M. (2000). "Immunologic diagnosis of tuberculosis." Clin Infect Dis **30**(3): 243-6.
- Ghosh, J., P. Larsson et al. (2009). "Sporulation in mycobacteria". Proc Natl Acad Sci USA **106**:10781-86.
- Gilroy, D. and J. Sherigar (2006). "Concurrent small bowel lymphoma and mycobacterial infection: use of adenosine deaminase activity and polymerase chain reaction to facilitate rapid diagnosis and treatment." Eur J Gastroenterol Hepatol **18**(3): 305-7.
- Glickman, M., J. Cox, et al. (2000). "A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*." Mol Cell **5**: 717-27.
- González-y-Merchand, J., M. García, et al. (1997). "Strategies used by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria to synthesize rRNA." J Bacteriol **179**(22): 6949-58.
- Goodfellow, M. (1998). Taxonomy of Mycobacteria. New York, ITP International Thompson Publishing.
- Goto, M., Y. Noguchi, et al. (2003). "Diagnostic value of adenosine deaminase in tuberculous pleural effusion: a meta-analysis." Ann Clin Biochem **40**(4): 374-81.
- Grosset, J., C. Truffot-Pernot, et al. (1983). "Activity of rifampicin administered daily and intermittently on experimental tuberculosis in mice" Pathol Biol **31**: 446-50.
- Grosset, J., C. Truffot-Pernot, et al. (1992). "Antagonism between isoniazid and the combination pyrazinamide-rifampicin against tuberculosis infection in mice" Antimicrob Agents Chemother **36**: 548-51.
- Grupo de trabajo del área TIR de SEPAR (2002). "Recomendaciones SEPAR. Normativa sobre la prevención de la tuberculosis." Arch Bronconeumol **38**: 441-51.
- Guerrant, G., M. Lambert, et al. (1981). "Gas-chromatographic analysis of mycolic acid cleavage products in mycobacteria" J Clin Microbiol **13**(5): 899-907.
- Gupta R, Espinal MA, Raviglione MC. (2004) "Tuberculosis as a major global health problem in the 21st century: a WHO perspective" Semin Respir Crit Care Med

25(3):245-53.

- Gutierrez, M., H. Villar, et al. (2006). "Pulmonary mycobacteriosis in non HIV patients, Buenos Aires City, 2003-2004" Medicina **66**(2): 139-43.
- Heifets, L. (1996). "Clinical mycobacteriology. Drug susceptibility testing." Clin Lab Med **16**(3): 641-56.
- Hernández-Pando, R., M. Jeyanathan, et al. (2000). "Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection." Lancet **356**: 2133-7.
- HersHKovitz, I., H.D. Donoghue, D.E. Minnikin, et al. (2008). "Detection and molecular characterization of 9000-Year Old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic settlement in Eastern Mediterranean" PLoS ONE 2008; 3:e3426.Doi:10.1371/journal.pone.0003426
- Higuchi, R. and S. Kwok (1991). "Avoiding false positives with PCR." Nature **339**: 237-8.
- Hobby, G., O. Auerbach, et al. (1954). "The late emergence of *M. tuberculosis* in liquid cultures of pulmonary lesions resected from humans." Am Rev Tuberc **70**: 191-218.
- Holland, P., R. Abramson, et al. (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase." Proceedings of The National Academy of Sciences USA **88**: 7276-80.
- Hopewell PC (1994) Overview of clinical tuberculosis. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis. Pathogenesis, Protection and Control. Washington DC: American Society for Microbiology. pp:25-46.
- Hu, Y. and R. Coates (2001). "Increased levels of sigJ mRNA in late stationary phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis* detected by DNA array hybridisation." FEMS Microbiol Lett **202**: 59-65.
- Hu, Y., J. Mangan, et al. (2000). "Detection of rRNA transcripts and active transcription in persistent *Mycobacterium tuberculosis* induced by exposure to rifampicin or pyrazinamide." J. Bacteriol **182**: 6358-65.
- Huebner, R., M. Schein, et al. (1993). "The tuberculin skin test." Clin Infect Dis **17**: 968-75.
- Inderlied, C. and L. Bermudez (1993). "The *Mycobacterium avium* complex." Clin Microbiol Rev **6**: 266-310.
- Jackett, P., G. Bothamley, et al. (1988). "Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis." J Clin Microbiol **26**(11): 2313-8.
- Jasmer, R., P. Nahid, et al. (2002). "Clinical practice. Latent tuberculosis infection." N Engl J Med **347**: 1860-6.

- Kaech, S., E. Wherry, et al. (2002). "Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development." Nat Rev Immunol **2**(4): 251-62.
- Kaltenboeck, B. and C. Wang (2005). "Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics." Adv Clin Chem **40**: 219-59.
- Kaprelyants, A. (1993). "Dormancy in non-sporulating bacteria." FEMS Microbiology Reviews **104**: 271-86.
- Kashyap, R., R. Kainthla, et al. (2006). "Rapid diagnosis of tuberculous meningitis using the Simple Dot ELISA method." Med Sci Monit **9**(11): 123-6.
- Keers, R. (1978). Pulmonary Tuberculosis, A Journey down the Centuries. London.
- Klein, D. (2002). "Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations" Trends Mol Med **8**: 257-60.
- Kolter R, Siegle DA, Tormo A (1993). "The stationary phase of the bacterial life cycle" Annu Rev Microbiol **47**:855-74.
- Koneman, E., S. Allen, et al. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Washington.
- Korzeniewska-Kosella, M., J. Kryszewski, et al. (1994). "Tuberculosis in young adults and the elderly: a prospective comparison study." Chest **106**: 28-32.
- Kremer, L., S. Gurucha, et al. (2002). "Temperature-induced changes in the cell-wall components of *Mycobacterium thermoresistibile*" Microbiology **148**: 3145-54.
- Kristki, A. & Fiuza de Melo F.A. (2007). "Tuberculosis in Adults" In: Palomino, Leao & Ritacco (Eds.) "Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care" BourcillierKamps.com.
- Kühne, B. and P. Oschmann (2002). "Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis." Biotechniques **33**(5): 1078-82.
- Kussell, E., R. Kishony, et al. (2005). "Bacterial Persistence: A Model of Survival in Changing Environments." Genetics **169**: 1807-14.
- Lalvani, A. and A. Hill (1998). "Cytotoxic T-lymphocytes against malaria and tuberculosis: from natural immunity to vaccine design." Clin Sci **95**(5): 531-8.
- Lalvani, A., P. Nagvenkar, et al. (2001). "Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians." J Infect Dis **183**: 469-77.
- Lambert, M., C. Moss, et al. (1986). "Analysis of mycolic acid cleavage products and cellular fatty acids of *Mycobacterium* species by capillary gas chromatography." J Clin Microbiol **23**(4): 731-6.
- Laverdiere, M., L. Poirier, et al. (2000). "Comparative evaluation of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for the detection of mycobacteria from clinical specimens: clinical relevance of higher recovery rates from broth-based

- detection systems." Diagn Microbiol Infect Dis **36**(1): 1-5.
- Leao, S.C. & Portaels, F. (2007). "History". In: Palomino, Leao & Ritacco (Eds.) "Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care" BourcillierKamps.com.
- Lim, A., B. Eleuterio, et al. (1999). "Oxygen depletion-induced dormancy in *Mycobacterium bovis* BCG" J Bacteriol **181**: 2252-6.
- Lobo Barrero, C. and E. Pérez Escolano (2001). "Control y supervisión del enfermo tuberculoso." Arch Bronconeumol **38**: 43-7.
- López-Cortés, L., M. Cruz-Ruiz, et al. (1995). "Adenosine deaminase activity in the CSF of patients with aseptic meningitis: utility in the diagnosis of tuberculous meningitis or neurobrucellosis." Clin Infect Dis **20**(3): 525-30.
- Loening, U.E. (1969). "The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by Polyacrylamide-Gel Electrophoresis". Biochem. J. **113**:131-138.
- Manuel, O. and D. Kumar (2008). "QuantiFERON-TB Gold assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection." Expert Rev Mol Diagn **8**(3): 247-56.
- Margolin, W. (2000). "Themes and variations in prokaryotic cell division." FEMS Microbiology Reviews **24**: 531-48.
- Martín, C. (2005). "The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG?" Eur Respir J **26**(1): 162-7.
- Martín, C. (2006). "Tuberculosis vaccines: past, present and future." Current Opinion in Pulmonary Medicine **12**: 186-191.
- McCune, R., F. Feldmann, et al. (1966). "Microbial persistence. I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues." J Exp Med **123**: 445-68.
- McCune, R., W. McDermott, et al. (1956). "The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. II. The conversion of tuberculous infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug." J Exp Med **104**: 763-802.
- McKinney, J. (2000). "Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase." Nature **406**: 735-8.
- Mendizies, D. (1999). "Interpretation of repeated tuberculin test. Boosting, conversion and reversion." Am J Respir Crit Care Med **159**: 15-21.
- Menendez, M.C., M.J. Garcia et al. "Characterization of an rRNA operon (*rrnB*) of *Mycobacterium fortuitum* and other mycobacterial species; implications for the classification of mycobacteria". Journal of Bacteriology. **184**: 1078-1088. 2002
- Menzies, D., M. Pai, et al. (2007). "Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for

- research." Ann Intern Med **146**(5): 340-54.
- Mukherjee, J., M. Rich, et al. (2004). "Programmes and principles in treatment of multidrug-resistant tuberculosis" Lancet **363**(9407): 474-81.
- Mullis, K. (1990). "The unusual origin of the polymerase chain reaction" Scientific American **262**(4): 56-61, 64-5.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction" Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51**: 263-73.
- Muttucumaru, D. (2004). "Gene expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* in a non-replicating state" Tuberculosis **84**: 239-46.
- Nelson, S., M. Deike, et al. (1998). "Value of examining multiple sputum specimens in the diagnosis of pulmonary tuberculosis" J Clin Microbiol **36**(2): 467-9.
- Neyrolles, O., R. Hernández-Pando, F. Pietri-Rouxel, et al. (2006). "Is the adipose tissue a place for *M. tuberculosis* persistence?" Plos ONE: 1:e43. Doi:10.1371/journal.pone.0000043.
- Nogales, C., S. Bernal, et al. (1999). "Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems." J Clin Microbiol **37**(10): 3432-3.
- Nuermberger, E., W. Bishai, et al. (2004). "Latent tuberculosis infection." Semin Respir Crit Care Med **25**(3): 317-36.
- Nuermberger, E., I. Rosenthal, et al. (2006). "Combination chemotherapy with the nitro-imidazopyran PA-824 and first-line drugs in a murine model of tuberculosis." Antimicrobial Agents Chemotherapy **50**: 2621-2625.
- Nystrom, T. (2001). "Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death." Arch Microbiol **176**: 159-64.
- Ojha A.K., A.D. Baughn, D. Sambandan, et al. (2008). "Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria." Molecular Microbiology **69**: 164-174.
- Ortalo-Magne, A. and M. Daffe (1996). "The outermost capsular arabinomannans and other mannoconjugates of virulent and avirulent tubercle bacilli." Microbiology **142**: 927-935.
- Pai, M., K. Dheda, et al. (2007). "T-cell assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: moving the research agenda forward." Lancet Infect Dis **7**(6): 428-38.
- Pai, M., L. Riley, et al. (2004). "Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review." Lancet Infect Dis **4**(12): 761-76.
- Palomino, J. (2005). "Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field." Eur Respir J **26**(2): 339-50.

- Palomino, J., S. Cardoso Leão, et al. (2007). "<http://www.tuberculosis-textbook.com/tuberculosis2007.pdf>."
- Patiño, S., L. Alamo, et al. (2008). "Autofluorescence of mycobacteria as a tool for detection of *Mycobacterium tuberculosis*." J Clin Microbiol **46**(10): 3296-302.
- Pelacic, V., M. Jackson, et al. (1997). "Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10955-60.
- Pérez-Rodríguez, E. and D. Jiménez Castro (2000). "The use of adenosine deaminase and adenosine deaminase isoenzymes in the diagnosis of tuberculous pleuritis." Curr Opin Pulm Med **6**(4): 259-66.
- Peyron, P., J. Vanborgeix, Y. Poquet, et al. (2008). "Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence" PLoS Pathog: 4:e0204.Doi:10.1371/journal.ppat.1000204.
- Pfyffer, G., H. Welscher, et al. (1997) "Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli." J Clin Microbiol **35**(2): 364-8.
- Piersimoni, C., C. Scarparo, et al. (2001). "Comparison of MB/Bact alert 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study." J Clin Microbiol **39**(2): 651-7.
- Pina, J., A. Domínguez, et al. (2002). "La respuesta a la prueba de tuberculina en enfermos tuberculosos." Arch Bronconeumol **38**: 568-73.
- Ponchel, F., C. Toomes, et al. (2003). "Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions." BMC Biotechnol **3**: 18.
- Pottumarthy, S., A. Morris, et al. (1999) "Evaluation of the tuberculin gamma interferon assay: potential to replace the Mantoux skin test." J Clin Microbiol **37**(10): 3229-32.
- Primm, T., S. Andersen, et al. (2000). "The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long term survival." J Bacteriol **182**: 4889-98.
- Rastogi, N. and C. Sola (2001). "The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis." Rev Sci Tech **20**(1): 21-54.
- Rebollo, MJ., González-Escalada, A., Hernández-Pando, R., Aguilar León, D., Palenque, E., Martínez, MA., D'Alessandro, A., García García, MJ. (Pendiente de Publicación) "Detection of Mycobacterial DNA in human bone marrow tissues with and without granulomas"

- Restrepo, B.I., D.I. Gómez *et al.* (2006). "Selective enrichment and detection of mycobacterial DNA in paucibacillary specimens". J. Microbiol. Meth. **67**:220-229.
- Reuter, H., L. Burgess, et al. (2006). "Diagnosing tuberculous pericarditis." QJM **99**(12): 827-39.
- Rhen, M., S. Eriksson, et al. (2003). "The basis of persistent bacterial infections." AnnuRev Microbiol **47**: 855-74.
- Richeldi, L. (2006). "An update on the diagnosis of tuberculosis infection." Am J Respir Crit Care Med **174**(7): 736-42.
- Roche (2000). Light Cycler Operator's Manual.
- Roche (2005). Roche manual versión 3.5.
- Rohner, P., B. Ninet, et al. (1997). "Evaluation of the MB/BacT system and comparison to the BACTEC 460 system and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens." J Clin Microbiol **35**(12): 3127-31.
- Rothschild, B., L. Martin, et al. (2001). "*Mycobacterium tuberculosis complex* DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present." Clin Infect Dis **33**: 305-11.
- Ruhwald, M. & P. Ravn. (2009). "Biomarkers of latent TB infection". Expert Rev. Resp. Med. **3**(4):387-401.
- Rutledge, R. and C. Côté (2003). "Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves." Nucleic Acids Res **31**(16): 93.
- Sambrook, J. and D. W. Russel (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York.
- Sarkar, S., G. Sharma, et al. (1980). "Fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of pulmonary tuberculosis." Tubercle **61**(2): 97-9.
- Scanga, C., H. Mohan, et al. (1999). "Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model." Infect Immun **67**: 4531-8.
- Scarpato, C., P. Piccoli, et al. (2002). "Evaluation of the BACTEC MGIT 960 in comparison with BACTEC 460 TB for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens." Diagn Microbiol Infect Dis **44**(2): 157-61.
- Schmittgen, T. (2001). "Real-time quantitative PCR." Methods **25**: 383-5.
- Sendrail, M. (1981). Historia cultural de la enfermedad. Madrid.
- Shleeve, M., K. Bagranyan, et al. (2002). "Formation and resuscitation of "non-culturable" cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase." Microbiology **148**: 1581-91.
- Singh, U. and P. Seth (2002). "PCR diagnosis of tuberculosis--experience in India." Indian J Pediatr **69 Suppl 1**: S20-4.

- Smeulders, M., J. Keer, et al. (1999). "Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase." J Bacteriol **181**: 270-83.
- Smieja, M., C. Marchetti, et al. (1999). "Isoniazid for preventing tuberculosis in non-HIV infected persons." Cochrane Database Syst Rev **1**: **CD001363**.
- Smith, I. (2003). "*Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence." Clin Microbiol Rev **16**(3): 463-96.
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. (1997). "Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination" Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18):9869-74.
- Telenti, A., F. Marchesi, et al. (1993). "Rapid Identification of *Mycobacteria* to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis" J Clin Microbiol **31**(2): 175-8.
- Tortoli, E. (2003). "Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s." Clin Microbiol Rev **16**(2): 319-54.
- Tortoli, E., P. Cichero, et al. (1997). "Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study." J Clin Microbiol **37**(11): 3578-82.
- Tortoli, E., F. Lavinia, et al. (1998). "Early detection of *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC cultures by ligase chain reaction." J Clin Microbiol **36**(9): 2791-2.
- Tortoli, E., & J.C. Palomino. (2007). "New Diagnostic Methods". In: Palomino, Leao & Ritacco (Eds.) "Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care" BourcillierKamps.com.
- Tsukamura, M. and H. Toyama (1984). "Studies on the origin and clinical significance of smear-positive and culture-negative tubercle bacilli." Kekkaku **59**(8): 451-9.
- Tufariello, J., J. Chan, et al. (2003). "Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection." Lancet Infect Dis **3**(9): 578-90.
- Tufariello, J., W. Jacobs, Jr., et al. (2004). "Individual *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth in vitro and in vivo." Infect Immun **72**: 515-26.
- Tuon, F., M. Litvoc, et al. (2006). "Adenosine deaminase and tuberculous pericarditis--a systematic review with meta-analysis." Acta Trop **99**(1): 67-74.
- Ulrichs, T. (2005). "Differential organization of the local immune response in patients with active cavitary Tuberculosis or with nonprogressive tuberculoma." Journal Infectious Diseases **192**: 89-97.
- Vaccarezza, R. (1981). Sobre arte y tuberculosis. Buenos Aires.

- Vincent, M., J. Gumperz, et al. (2003). "Understanding the function of CD1-restricted T cells." Nat Immunol **4**(6): 517-23.
- Voskuil, M., K. Visconti, et al. (2004). "*Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy." Tuberculosis **84**(3-4): 218-27.
- Vuola, J., M. Ristola, et al. (2003). "Immunogenicity of an inactivated mycobacterial vaccine for the prevention of HIV-associated tuberculosis: a randomized, controlled trial." **17**(16): 2351-5.
- Wayne, L. (1960). "The bacteriology of respected tuberculosis pulmonary lesions. 2. Observations on bacilli which are stainable but which cannot be cultured." Am Rev Respir Dis **82**: 370-7.
- Wayne, L. (1994). "Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **13**: 908-14.
- Wayne, L. and L. Hayes (1996). "An in vitro model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence." Infect Immun **64**: 2062-9.
- Wayne, L. and G. Kubica (1986). Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, The Williams and Wilkins Co.
- WHO (2003). Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. Geneva.
- WHO (2004). Compendium of indicators for monitoring and evaluating National Tuberculosis Programs. Geneva.
- WHO (2006). Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing Geneva.
- WHO (2006). Stop TB Partnership and World Health Organization. Global Plan to Stop TB. Geneva.
- Wilhelm, J. and A. Pingoud (2003). "Real-time polymerase chain reaction." Chembiochem **4**: 1120-8.
- Williams-Bouyer, N., R. Yorke, et al. (2000). "Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria." J Clin Microbiol **38**(11): 4167-70.
- Wong, M. and J. Medrano (2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation." Biotechniques **39**: 75-85.
- Woods, G. (2002). "The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques." Infect Dis Clin North Am **16**(1): 127-44.
- Woods, G., G. Fish, et al. (1997). "Clinical evaluation of difco ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria." J Clin Microbiol **35**(1): 121-4.
- Yamazaki, Y., L. Danelishvili, M. Wu, M. Macnab, L.E. Bermudez. (2006). "*Mycobacterium avium* genes associated with the ability to form a biofilm."

- Appl. Environmental Microbiology **72**: 819-825.
- Yassin, M. and L. Cuevas (2003). "How many sputum smears are necessary for case finding in pulmonary tuberculosis." Trop Med Int Health **8**(10): 927-32.
- Young, D. (2003). "Building a better tuberculosis vaccine." Nat Med **9**(5): 503-4.
- Young, D., M. Perkins, et al. (2008). "Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis." J Clin Invest **118**(4): 1255-65.
- Zhang, Y. (2004). "Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis." Front Biosci **9**: 1136-56.
- Zhu, W., B. Plikaytis, et al. (2003). "Resuscitation factors from mycobacteria: homologs of *Micrococcus luteus* proteins." Tuberculosis **83**: 261-9.
- Zink, A., C. Sola, et al. (2003). "Characterization of *Mycobacterium tuberculosis complex* DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping." J Clin Microbiol **41**: 359-67.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA NO CITADA

- . "http://www.latenttuberculosis.com."
- . "http://www.webtb.org."
- . http://www.who.int/topics/tuberculosis.

- Alsina, J. (1982). Los orígenes helénicos de la medicina occidental. Barcelona.
- Andersen, P, T. M. Doherty, et al. (2007). "The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted?" Trends Mol Med **13**(5): 175-82.
- Aoki, M. (2004). "Transmission of tuberculosis (I)." Kekkaku **79**(9): 509-18.
- Ausubel, F. M. (1992). Chapter 2. Preparation and Analysis of DNA. Short Protocols in Molecular Biology. 2nd New York, John Wiley & Sons: 10-32.
- Báguena, M. (1992). La Tuberculosis y su historia.
- Balaban, N., J. Merrin, et al. (2004). "Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch." Science **305**: 1622-25.
- Barnes, P. F. (2004). "Diagnosing latent tuberculosis infection: turning glitter to gold." Am J Respir Crit Care Med **170**(1): 5-6.
- Barnes, P. F. (2006). "Weighing gold or counting spots: which is more sensitive to diagnose latent tuberculosis infection?" Am J Respir Crit Care Med **174**(7): 731-2.

- Betts, J. (2002). "Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling." Molecular Microbiology **43**: 717-31.
- Bhatt, K. and P. Salgame (2007). "Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*." J Clin Immunol **27**(4): 347-62.
- Boshoff, H. and C. Barry, III. (2005). "Tuberculosis- Metabolism and respiration in the absence of growth." Nature Reviews **3**: 70-80.
- Bouvet, E. and D. Bonnet (2008). "New tools for diagnosis of latent tuberculosis infection." Pathol Biol (Paris) **56**(2): 84-7.
- Brock, I., K. Welding, et al. (2004). "Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts." Am J Respir Crit Care Med **170**(1): 65-9.
- Bua, A., P. Molicotti, et al. (2007). "QuantiFERON TB Gold: a new method for latent tuberculosis infection." New Microbiol **30**(4): 477-80.
- Burman, W. (2007). "Short-course regimens for latent tuberculosis: what is ready for prime time?" Enferm Infecc Microbiol Clin **25**(5): 297-9.
- Cardona, P. and J. Ruiz-Manzano (2004). "On the nature of *Mycobacterium tuberculosis*-latent bacilli." Eur Respir J **24**(6): 1044-51.
- Cardoso-Scherer, L., R. Sperhake, et al. (2007). "PCR colorimetric dot-blot assay and clinical pretest probability for diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Smear-Negative patients." BMC Public Health **7**(356).
- Casal, M., J. Gutiérrez, et al. (1997). "Clinical interest of a new simple system for isolating *Mycobacterium tuberculosis*" Rev Clin Esp **197**(3): 148-51.
- Chakravarthy, S., M. Dudeja, et al. (2005). "Utility of Universal Sample Processing Methodology, Combining Smear Microscopy Culture, and PCR, for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis." J Clin Microbiol **43**(6): 2703-8.
- Chan, J. and J. Flynn (2004). "The immunological aspects of latency in tuberculosis." Clin Immunol **110**(1): 2-12.
- Chee, C., K. KhinMar, et al. (2007). "Latent tuberculosis infection treatment and T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens." Am J Respir Crit Care Med **175**(3): 282-7.
- Cho, S. (2007). "Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis." Yonsei Med J **48**(3): 347-59.
- Codina-Grau, M. and M. Tórtola-Fernández (2006). "Utilidad diagnóstica de la detección de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa realizada en tiempo real." Enferm Infecc Microbiol Clin **24**: 539-40.
- Cohn, D. (2003). "Treatment of latent tuberculosis infection." Semin Respir Infect

- 18(4): 249-62.
- Conaty, S., A. Clxton, et al. (2005). "The interpretation of nucliec acid amplification test for tuberculosis: do rapid tests change treatment decisions?" J Infect **50**: 187-92.
- Daniel, T. (2006). "The history of tuberculosis." Respir Med **100**(11): 1862-70.
- Davies, P. and F. Drobniewski (2006). "The use of interferon-gamma-based blood tests for the detection of latent tuberculosis infection." Eur Respir J **28**(1): 1-3.
- Diez, M., A. Diaz, et al. (2007). "Prevalence of *M. tuberculosis* infection and tuberculosis disease among HIV-infected people in Spain." Int J Tuberc Lung Dis **11**(11): 1196-202.
- Dinnes, J., J. Deeks, et al. (2007). "A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection." Health Technol Assess **11**(3): 1-196.
- Domenech, P., M. Menendez, et al. (1994). "Restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes in the differentiation of fast-growing mycobacterial species." FEMS Microbiol Lett **116**(1): 19-24.
- Dooley, K. and T. Sterling (2005). "Treatment of latent tuberculosis infection: challenges and prospects." Clin Chest Med **26**(2): 313-26, VII.
- Dorronsoro, I. and L. Torroba (2007). "Microbiología de la Tuberculosis." An Sist Sanit Navar **30**(2): 67-84.
- Dye, C. (2006). "Global epidemiology of tuberculosis." Lancet **367**: 938-40.
- Enarson, D., A. Seita, et al. (2003). "Global elimination of tuberculosis: implementation, innovation, investigation." Int J Tuberc Lung Dis **7**(Suppl 3): 328-32.
- Enarson, D., D. Van Soolingen, et al. (2003). Mycobacteria and Tb. Berlin.
- Flament-Saillour, M. and C. Perronne (1997). "The natural history of tuberculosis infection and skin tuberculin reaction." Med Mal Infect **14**(5): 27-32.
- Flynn, J. (2004). "Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development." Tuberculosis (Edinb) **84**(1-2): 93-101.
- Frothingham, R., J. Stout, et al. (2005). "Current issues in global tuberculosis control." Int J Infect Dis **9**(6): 297-311.
- Geluk, A., M. Lin, et al. (2007). "T-cell recognition of the HspX protein of *Mycobacterium tuberculosis* correlates with latent *M. tuberculosis* infection but not with *M. bovis* BCG vaccination." Infect Immun **75**(6): 2914-21.
- Gómez, J. and J. McKinney (2004). "*M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance." Tuberculosis (Edinb) **84**(1-2): 29-44.
- Gordillo, S., E. Guirado, et al. (2006). "Usefulness of *acr* expression for monitoring latent *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in 'in vitro' and 'in vivo' experimental models" Scand J Immunol **64**(1): 30-9.

- Hampshire, T., S. Soneji, et al. (2004). "Stationary phase gene expression of *Mycobacterium tuberculosis* following a progressive nutrient depletion: a model for persistent organisms?" Tuberculosis (Edinb) **84**(3-4): 228-38.
- Harries, A. and C. Dye (2006). "Tuberculosis." Ann Trop Med Parasitol **100**(5-6): 415-31.
- Hashimoto, T., K. Suzuki, et al. (1995). "Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputa by the Amplification of IS6110." Int Med **34**(7): 605-10.
- Heifets, L. (1996). "The mycobacteriology laboratory. Past, present, and future." Clin Lab Med **16**(3): 513-25.
- Hernández, C., A. Cetner, et al. (2008). "Tuberculosis in the age of biologic therapy." J Am Acad Dermatol **59**(3): 363-80; quiz 382-4.
- Hizel, K., I. Maral, et al. (2004). "The influence of BCG immunisation on tuberculin reactivity and booster effect in adults in a country with a high prevalence of tuberculosis." Clin Microbiol Infect **10**(11): 980-3.
- Ho, T. and J. Hull (2006). "Tests for latent tuberculosis." Nephrol Dial Transplant **21**(7): 2029.
- Hopewell, P., M. Pai, et al. (2006). "International Standards for Tuberculosis Care." Lancet Infect Dis **6**: 710-25.
- Huard, R., L. De-Oliveira, et al. (2003). "PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis complex* on the basis of genomic deletions." J Clin Microbiol **41**: 1637-50.
- Inge, L. and J. Wilson (2008). "Update on the treatment of tuberculosis." Am Fam Physician **78**(4): 457-65.
- Kashino, S., P. Owendale, et al. (2006). "Unique model of dormant infection for tuberculosis vaccine development." Clin Vaccine Immunol **13**(9): 1014-21.
- Keeler, E., M. Perkins, et al. (2006). "Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics." Nat Rev Microbiol: 49-57.
- Koneman, E., D. Allen, et al. (2000). Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia.
- Kremer, L. and G. Besra (2005). Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. Washington, DC.
- Kunst, H. (2006). "Diagnosis of latent tuberculosis infection: the potential role of new technologies." Respir Med **100**(12): 2098-106.
- Lagrange, P., N. Simonney, et al. (2007). "New immunological tests in the diagnosis of tuberculosis." Rev Mal Respir **24**(4 Pt 1): 453-72.
- Laín-Entralgo, P. (1982). Historia de la Medicina. Barcelona.
- Lalvani, A. (2007). "Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to

- tackle an old enemy." Chest **131**(6): 1898-906.
- Locht, C., C. Rouanet, et al. (2007). "How a different look at latency can help to develop novel diagnostics and vaccines against tuberculosis." Expert Opin Biol Ther **7**(11): 1665-77.
- Lowrie, D. (2006). "DNA vaccines for therapy of tuberculosis: where are we now?" Vaccine **24**(12): 1983-9.
- Maartens, G. and R. Wilkinson (2007). "Tuberculosis." Lancet **370**(9604): 2030-43.
- Manabe, Y. and W. Bishai (2000). "Latent *Mycobacterium tuberculosis*-persistence, patience, and winning by waiting." Nature **6**(12): 1327-8.
- Mason, C. and J. Ali (2004). "Immunity against mycobacteria." Semin Respir Crit Care Med **25**(1): 53-61.
- Mdluli, K. and M. Spigelman (2006). "Novel targets for tuberculosis drug discovery." Curr Opin Pharmacol **6**(5): 459-67.
- Moorman, L. (1944). La tuberculosis en los grandes genios. Buenos Aires.
- Murphy, B., B. Singer, et al. (2003). "On treatment of tuberculosis in heterogeneous populations." J Theor Biol **223**(4): 391-404.
- Murray, C. and J. Salomon (1998). "Modeling the impact of global tuberculosis control strategies." Proc Natl Acad Sci **95**: 13881-6.
- Myers, J. (2005). "New recommendations for the treatment of tuberculosis." Curr Opin Infect Dis **18**(2): 133-40.
- Nahid, P., M. Pai, et al. (2006). "Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis." Proc Am Thorac Soc **3**(1): 103-10.
- Pai, M., S. Kalantri, et al. (2006). "New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part I. Latent tuberculosis." Expert Rev Mol Diagn **6**(3): 413-22.
- Palma-Nicolas, J. and V. Bocanegra-Garcia (2007). "Innovative strategies to diagnose and monitor tuberculosis patients." Arch Bronconeumol **43**(4): 225-32.
- Parsons, L., R. Brosch, et al. (2002). "Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis complex* isolates by PCR-based genomic deletions analysis." J Clin Microbiol **40**: 2239-45.
- Pilsczek, F. and S. Kaufmann (2008). "Different diagnostic criteria for latent tuberculosis are applied in laboratory-based research papers." J Infect **56**(2): 159-61.
- Powell, D. (2008). "Latent tuberculosis needs attention." Arch Pediatr Adolesc Med **162**(5): 489-90.
- Pozos, T. and L. Ramakrishnan (2004). "New models for the study of *Mycobacterium*-host interactions." Current Opinion in Immunology **16**: 499-505.

- Purohit, H., S. Cheema, et al. (2007). "In Search of Drug Targets for *Mycobacterium tuberculosis*." Infect Disord Drug Targets **7**(3): 245-50.
- Raviglioni, M. (1997). "Assessment of world-wide Tuberculosis control. WHO global surveillance and monitoring project." Lancet **350**: 624-9.
- Restrepo, B. (2004). "New tools for detection of latent tuberculosis" Biomedica **24 Supp 1**: 202-11.
- Riska, P. and S. Carleton (2002). "Latent tuberculosis: models, mechanisms, and novel prospects for eradication." Semin Pediatr Infect Dis **13**(4): 263-72.
- Romero-Hernández, C. (2000). "La tuberculosis en la época del romanticismo europeo. Un recorrido literario." Rev Inst Nal Enf Resp Mex **13**(1): 63-4.
- Ross, L. and M. Goff (2005). "Latent tuberculosis infection and BCG vaccination." J Midwifery Womens Health **50**(4): 344-7.
- Rothel, J. and P. Andersen (2005). "Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent?" Expert Rev Anti Infect Ther **3**(6): 981-93.
- Rusch-Gerdes, S. and D. Hillemann (2008). "Modern laboratory diagnostics for mycobacteria." Pneumologie **62**(9): 533-40.
- Safi, H., P. Barnes, et al. (2004). "IS6110 functions as a mobile monocyte-activated promoter in *Mycobacterium tuberculosis*." Mol Microbiol.
- Saltini, C. (2006). "Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis." Respir Med **100**(12): 2085-97.
- Schluger, N. (2003). "The diagnosis of tuberculosis: what's old, what's new" Semin Respir Infect **18**(4): 241-8.
- Skeiky, Y. and J. Sadoff (2006). "Advances in tuberculosis vaccine strategies." Nat Rev Microbiol **4**(6): 469-76.
- Soumitesh, C., M. Sen, et al. (2005). "Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by Smear, Culture, and PCR Using Universal Sample Processing Technology." J Clin Microbiol **43**(9): 4357-62.
- Spigelman, M. (2007). "New tuberculosis therapeutics: a growing pipeline." J Infect Dis **196 Suppl 1**: S28-34.
- Sterling, T. (2008). "New approaches to the treatment of latent tuberculosis." Semin Respir Crit Care Med **29**(5): 532-41.
- Stewart, G., B. Robertson, et al. (2003). "Tuberculosis: a problem with persistence." Nat Rev Microbiol **1**(2): 97-105.
- Suffys, P., J. Palomino, et al. (2000). "Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*." Int J Lung Dis **4**: 179-83.
- Truffot-Pernot, C., N. Veziris, et al. (2006). "Modern diagnosis of tuberculosis." Presse

Med **35**(11 Pt 2): 1739-46.

Van-Embden, J., D. Van-Gorkom, et al. (2000). "Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis complex* bacteria." J Bacteriol **182**: 2392-401.

Whalen, C. (2005). "Diagnosis of latent tuberculosis infection: measure for measure." JAMA **293**(22): 2785-7.

Wiker, H., T. Mustafa, et al. (2006). "Vaccine approaches to prevent tuberculosis." Scand J Immunol **64**(3): 243-50.